

Stereochemie des biologischen Ringschlusses bei Carotinen: Synthese von spezifisch markierten deuterierten Vorläufern und Einbauexperimente

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophischen Fakultät II

der Universität Zürich

von

SASANK SEKHAR MOHANTY

Puri (Indien)

Begutachtet von Herrn Prof. Dr. C. H. Eugster

Zürich 1988

Zentralstelle der Studentenschaft



**Stereochemie des biologischen Ringschlusses bei Carotinen:
Synthese von spezifisch markierten deuterierten Vorläufern
und Einbauexperimente**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophischen Fakultät II

der Universität Zürich

von

SASANK SEKHAR MOHANTY

Puri (Indien)

Begutachtet von Herrn Prof. Dr. C. H. Eugster

Zürich 1988

Zentralstelle der Studentenschaft



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Meiner Familie

Meinem geschätzten Lehrer,

Herrn Prof. Dr. C. H. Eugster

unter dessen Leitung die vorliegende Arbeit entstanden ist, danke ich herzlich für die gestellte Aufgabe, sein stetes Interesse und die wertvollen Anregungen. Vor allem schätzte ich die Freiheit, die er mir gegeben hat, diese Arbeit selbständig auszuführen.

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2. STEREOCHEMISCHE ASPEKTE DER RINGSCHLUSS-REAKTION	3
2.1. Allgemeines Cyclisierungsschema	3
2.2. Betrachtungen über die möglichen Konformationen des Vorläufers Lycopin	5
3. ANWENDUNG VON STABILEN ISOTOPEN IN DER CAROTINOIDBIOSYNTHESE	9
3.1. Vor- und Nachteile der stabilen Isotope gegenüber den Radioisotopen	9
3.2. Anwendung von stabilen Isotopen bei der Untersuchung der Carotinoidbiosynthese	11
3.2.1. Experimente mit Deuterium	11
3.2.1.1. Incubation mit [^1H]-Glucose in D_2O	13
3.2.2. Incorporationsexperimente mit [^{13}C]-Vorläufern	15
3.2.2.1. Einbau von [$2\text{-}^{13}\text{C}$]-MVA	15
3.2.2.2. Arbeiten mit [$^{13}\text{C}_6$]-Glucose	16
4. INCORPORATIONSVERSUCHE MIT RADIOISOTOP MARKIERTEN VORLÄUFERN	18
4.1. Einbau von [$2\text{-}^{14}\text{C}$]-MVA	18
4.2. Zusammenfassung der Resultate von Incorporationsversuchen	20
4.3. Bisherige biologische Cyclisierungen an markierten Lycopinen	21
4.4. Zusammenfassung	23
5. BISHER CHEMISCH SYNTHETISIERTE DEUTERIERTE SUBSTRATE UND MODELLVERBINDUNGEN	24
5.1. Synthese von [$16,16,16,16',16',16'\text{-}^2\text{H}_6$]-Lycopin	24
5.2. Synthese und Identifizierung von stereospezifisch-markierten [$16,16,16,16',16',16'\text{-}^2\text{H}_6$]- β -, β -, β -, ϵ -, γ -, γ -Carotinen	25

6. EIGENE ARBEITEN I: SYNTHESSEN	27
6.1. Zielsetzung und Verlauf der Arbeit	27
6.2. Bisherige Synthesen von rac. an C(3) funktionalisiertem Mevalolacton	28
6.3. Stereoselektive Synthese von an der terminalen (E)-Methylgruppemarkiertem Isoprenoid-diphosphorsäureestern	33
6.3.1. Synthese von C ₅ , C ₁₀ , C ₁₅ und C ₂₀ -[² H ₃]- markierten Polyprenolen (Dimethylallylalkohol, Geraniol, Farnesol, Geranylgeraniol)	34
6.3.1.1. Synthesekonzept	34
6.3.1.2. Durchführung der eigenen Synthese	35
6.4. Prenylpyrophosphate	40
7. EIGENE ARBEITEN II: EINBAUVERSUCHE UND RESULTATE	42
7.1. Probleme der Analytik	42
7.1.1. Massenspektrometrie	42
7.1.2. Infrarotspektroskopie	43
7.1.3. Kernresonanzspektroskopie	44
7.1.4. Circular dichroismus	44
7.2. <i>In vitro</i> - Experimente zur Biosynthese von Carotinoiden	45
7.2.1. Experimente mit intakten Chloroplasten	46
7.2.2. Experimente mit einem zellfreien System aus <i>Phycomyces blakesleeana</i>	47
7.2.3. Experimente im <i>Flavobacterium R1560</i>	47
7.2.3.1. Incubation mit [² H ₃]-C(3')-MVA	48
7.2.3.2. Kultur und Incubationsbedingungen	48
7.2.3.3. Isolation und Reinigung des Zeaxanthins	49
7.2.3.4. Identifizierung des biosynthetisierten Zeaxanthins	50
7.2.3.5. Interpretation dieses Resultats	51
7.2.4. Incorporationsexperiment mit [16,16,16,16',16',16'- ² H ₆]-Lycopin	53

8. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	58
9. VERDANKUNGEN	61
10. EXPERIMENTELLER TEIL I: SYNTHESSEN	63
10.1. Allgemeines	63
10.2. Synthese	66
10.2.1. [$^2\text{H}_3$]-C(3')-MVA	66
10.2.2. Spezifisch markierte Isoprenoide	71
10.2.3. Prenylpyrophosphate	82
11. EXPERIMENTELLER TEIL II: EINBAUVERSUCHE	83
11.2. Mikrobiologische Arbeiten	83
11.2.1. Kulturbedingungen	83
11.3. Incorporationversuche	85
11.3.1. Mit [$^2\text{H}_3$]-C(3')-MVA	85
11.3.2. Isolierung und Reinigung der Carotinoide	85
11.3.3. Herstellung eines zellfreien Systems von <i>Flavobacterium R1560</i>	87
11.3.4. Mit [16,16,16,16',16'- $^2\text{H}_6$]- Lycopin	87
11.3.5. Isolierung und Identifizierung von Carotinen	88
12. LITERATURVERZEICHNIS	89

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

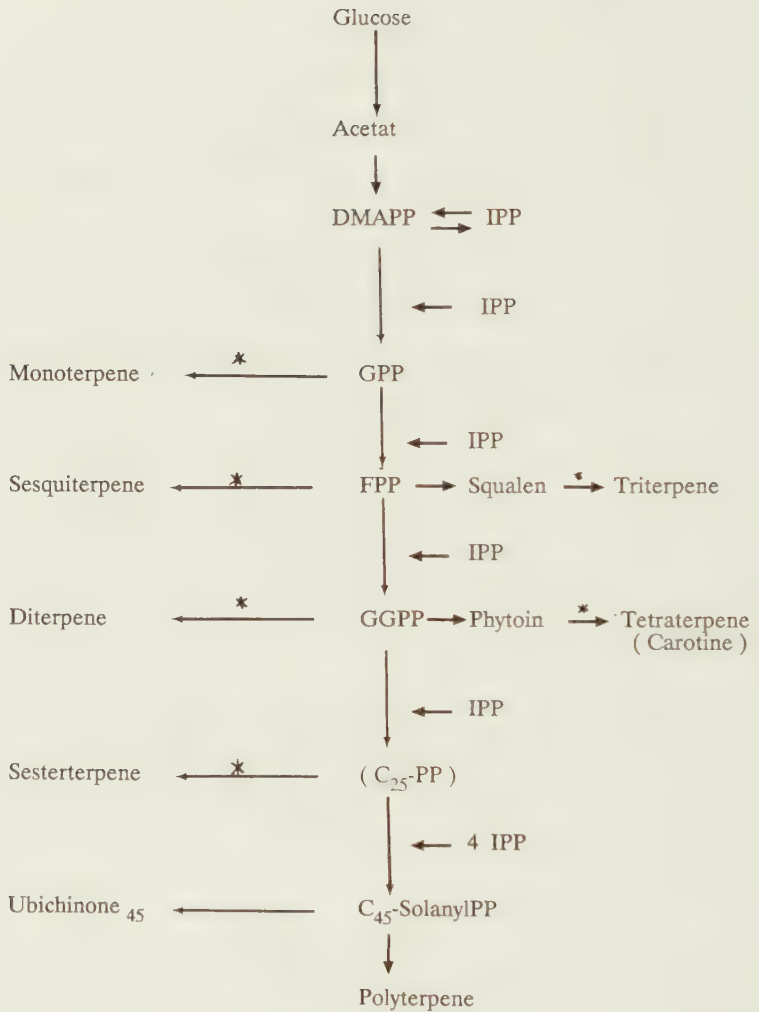
Die Isoprenoide stellen eine wichtige Klasse von Naturstoffen dar. Alle diese Verbindungen haben eine gemeinsame biosynthetische Herkunft. Sie lassen sich nach der Zahl ihrer Biosyntheseeinheiten in Monoterpene (C_{10}), Sesquiterpene (C_{15}), Diterpene (C_{20}), Sesterterpene (C_{25}), Triterpene (C_{30}), Tetraterpene (C_{40}) und Polyterpene ($(C_5)_n$) einteilen [1]. Viele Terpenoide, insbesondere die physiologisch bedeutsamen Carotinoide und Triterpene (mit den abgeleiteten Steroiden) besitzen mono- oder polycyclische Strukturen. Ringschlussreaktionen sind daher von erheblicher Bedeutung für die Terpenbiogenese (s. Schema 1).

Die Biosynthese der Carotinoide unterscheidet sich von der anderer Terpene vor allem dadurch, dass vor einem Ringschluss die Kette zuerst weitgehend dehydriert wird. Somit betrifft die Cyclisation nur die endständigen 1,5-Dien-Systeme, mit anderen Worten, es werden im Gegensatz zu Triterpene keine Bicyclen etc. gebildet. Die anerkannten Vorläufer für cyclische Carotine sind Lycopin und Neurosporin [2].

Bei der Biosynthese von Triterpenen und Steroiden wird ihre Stereochemie durch die Konformation des offenkettigen Vorläufers und dessen enantioselektive Epoxydierung determiniert, während Carotine, die ohne vorhergehende Epoxidierung cyclisiert werden, in ihrer Stereochemie nur von der Faltung des Vorläufers auf dem Enzym abhängen.

Eines der noch ungelösten Probleme im Zusammenhang mit dem Ringschluss bei Carotininen ist die Frage, wie und auf welcher Stufe sich die Wege zur β -, ϵ -, γ -Endgruppe gabeln (s. Schema 2). Durch gezielte Synthese von geeigneten, isotoptenmarkierten Vorläufern und deren Einbau in cyclische Carotine mit Hilfe eines biologisch-enzymatischen Systems soll die vorliegende Arbeit einen Beitrag zur Aufklärung der Stereochemie dieser Ringschlussreaktion leisten.





Schema 1: Schema der Biosynthese der Terpene

* Cyclisierungen

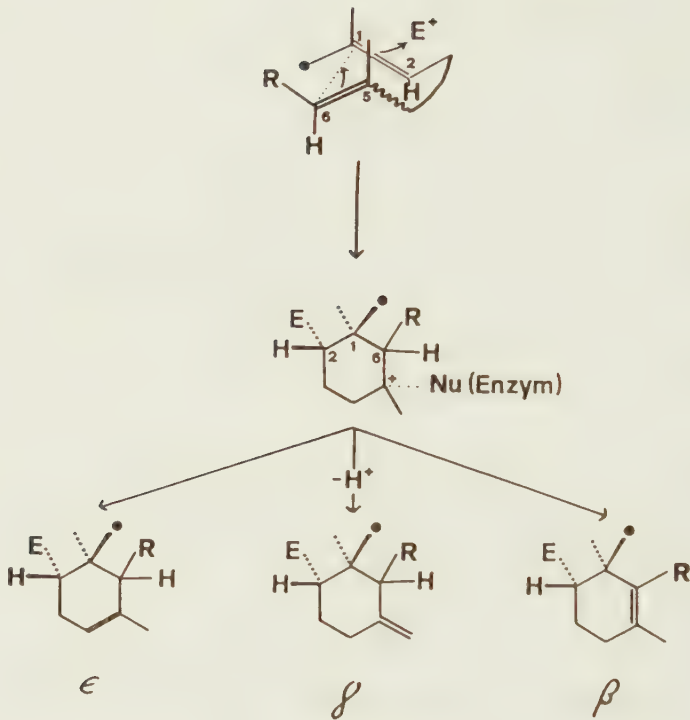
2. STEREOCHEMISCHE ASPEKTE DER RINGSCHLUSSREAKTION

2.1. Allgemeines Cyclisierungsschema (s.Schema 2)

Lycopin und Neurospurin, zwei Carotine mit ψ -Endgruppen, sind mit Hilfe von Inhibitorversuchen als Vorläufer der cyclischen Carotine nachgewiesen worden [4]. Häufig benützte Cyclase-Hemmer sind Nicotin[3,4,5] und CPTA*)[6]. Die Carotine mit β -, ϵ - und γ -Endgruppen lassen sich gemäss dem allgemeinen Cyclisationschema formal herleiten (Schema 2). Die Ringschlussreaktion wird durch einen Angriff eines Protons auf die endständige trisubstituierte Doppelbindung des offenkettigen Vorläufers im Sinne von Markownikoff ausgelöst. Dieser anscheinend konzertierte Reaktionsablauf führt zur Bindung C(6)-C(1) und zu einem Zwischenprodukt mit einem Carbeniumion an C(5).

Dieses Carbeniumion stabilisiert sich nun durch Elimination eines Protons entweder von C(4),C(6) oder $\text{CH}_3\text{-C}(5)$, was zur ϵ -, β -, γ -Endgruppe führt. Die in vivo -Umwandlung der drei Ringtypen ineinander wurde durch spezifische Isotopenmarkierung explizit ausgeschlossen [4]. Jedoch ist über die Beziehung zwischen der Konfiguration des Vorläufers ((SE)- bzw. (5Z)) und Art der Produkte (Stellung der Doppelbindung, Konfiguration (Chiralität bzw. Prochiralität)) wenig bekannt. Auch sind die Faktoren, welche die Bildung von β -, γ -, ϵ -Endgruppen beeinflussen, nicht klar. Zudem muss bezweifelt werden, dass die Stereochemie der Ringschlussreaktion in allen Carotin-synthetisierenden Organismen dieselbe ist[3] (s.Abschnitt 4.2).

*) Abkürzungen s.Seite 65



Schema 2: Allgemeines Cyclisierungsschema

2.2. Betrachtungen über die möglichen Konformationen des Vorläufers Lycopin (s.Schema 3 & 4)

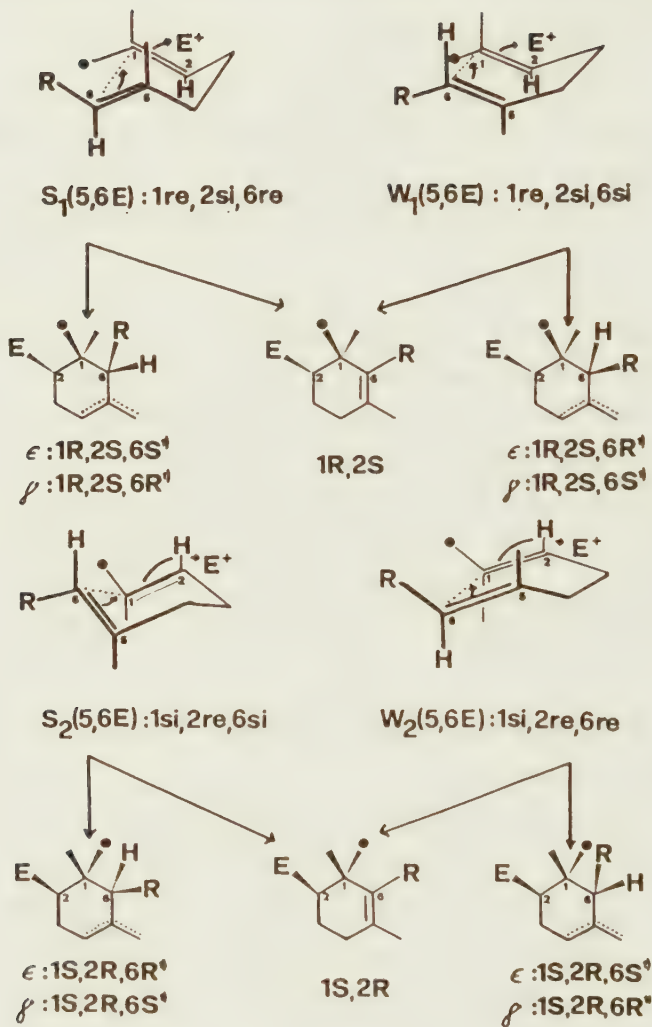
Folgende Annahmen werden getroffen:

- trans-Addition von Elektrophil und Nucleophil (5, 6-Doppelbindung) an die 1, 2-Doppelbindung;
- die Konformation des Substrats (Sessel oder Wanne) bleibt während der Cyclisierung fixiert.

Damit ergeben sich theoretisch acht stereochemisch verschiedene Faltungen ableiten, je zwei davon sind zueinander enantiomer [7, 8, 9, 10, 11].

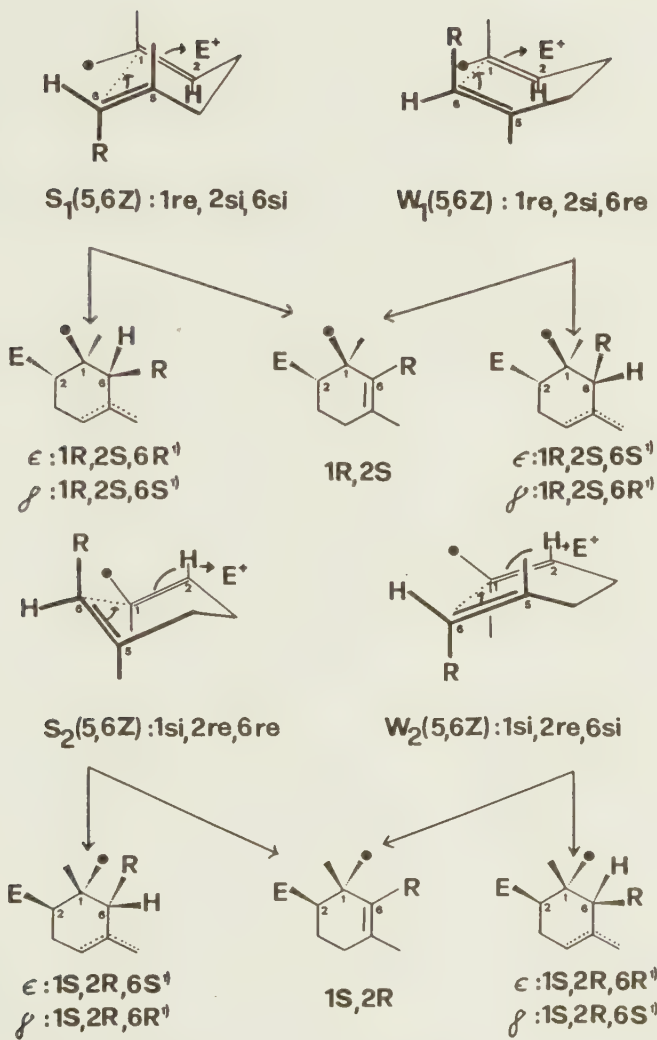
Als wichtige Konsequenzen aus diesen Betrachtungen folgt, dass aus stereoelektronischen Gründen entweder die Bildung des β - oder des ϵ -Ring bevorzugt ist. Ungedeutet bleibt nach wie vor die Bildung des allerdings sehr selten auftretenden γ -Ring. Die zehn verschiedenen Stereoisomere, die aus den acht verschiedenen Faltungen entstehen, sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Aus der Tabelle 1 lässt sich feststellen:

- dass das Elektrophil E und die (E)-Methylgruppe des Vorläufers im Produkt trans zueinander stehen müssen;
- dass stereochemisch identische Produkte aus einem Sessel und der zugehörigen Wanne mit umgekehrter Konfiguration der 5, 6-Doppelbindung gebildet werden.
- nimmt man an, dass die Doppelbindung des kationoiden Zwischenprodukts in stereoelektronisch kontrollierter Weise entsteht, ergibt sich folgendes Postulat: Aus dem (5E)-Vorläufer wird der β -Ring, aus dem (5Z)-Vorläufer der ϵ - (ev. γ -) Ring gebildet [7, 11].



^{*)} Zur Chiralitätsbestimmung gelten $-CH_3$ als $-CD_3$ und E als D.

Schema 3: Faltungen der (5E)-Vorläufer (aus [9])



[†]Zur Chiralitätsbestimmung gelten $-CH_3$ als $-CD_3$ und E als D.

Schema 4: Faltungen der (5Z)-Vorläufer

3. ANWENDUNG VON STABILEN ISOTOPEN IN DER CAROTINOIDBIOSYNTHESE

3.1 Vor- und Nachteile der stabilen Isotope gegenüber den Radioisotopen

Isotopenmarkierte Verbindungen sind unentbehrliche Werkzeuge in der biologischen Forschung. Ihr Einsatz erlaubt, das Schicksal eines bestimmten Moleküls in einem biologischen oder chemischen System zu verfolgen.

Die stabilen Isotope des Kohlenstoffs (^{13}C), Stickstoffs (^{15}N), Sauerstoffs (^{17}O & ^{18}O) und das oft verwendete Deuterium (^2H) sind zwischen 1929 und 1932 entdeckt worden (über ihre natürliche Häufigkeit orientiert Tabelle 2). Bald darauf sind sie bei biochemischen Studien angewendet worden. Die Entwicklung moderner analytischer Geräte hat den Nachweis dieser Isotope vereinfacht.

Tabelle 2:

Natürliches Vorkommen von stabilen Isotopen

Isotope	Natürliche Häufigkeit (%)	Kernspin
^2H	0,015	1
^{13}C	1,108	1/2
^{15}N	0,365	1/2
^{17}O	0,037	5/2
^{18}O	0,204	0
^{33}S	0,760	3/2
^{34}S	4,220	

Im Tabelle 3 sind die Vor- und Nachteile der stabilen bzw Radioisotope einander gegenüber - gestellt.

KRITERIEN	STABILE ISOTOPE	RADIOISOTOPE
1. Nachweisgrenze	mg	ng oder kleiner
2. Lokalisierung in Molekül	NMR, ev. MS (schnell, zuverlässig)	chemischer Abbau (zeitaufwendig)
3. Verdünnung mit unmarkierten Material	muss deutlich konzentrierter sein als natürliche Häufigkeit; hohe Einbauraten nötig.	sehr hohe Verdünnung möglich. hohe Einbauraten nicht wichtig.
4. Eindeutigkeit	dank NMR/MS Sicherheit, dass Markierung nicht in Verunreinigung sitzt.	Beweis, dass Markierung nicht in Verunreinigung sitzt, oft schwierig.
5. Handhabung	einfach kein Strahlungsproblem	aufwendig, kürzere Halbwertszeit, gefährlich, zeitraubend. Strahlung kann empfindliche Verbindungen schädigen.

3.2. Anwendung von stabilen Isotopen bei der Untersuchung der Carotinoidbiosynthese

Britton [12] hat ausführlich über die Verwendung von stabilen Isotopen (^2H , ^{13}C , ^{18}O) bei der Lösung vieler biosynthetischer Probleme in Carotininen berichtet.

Versuche mit $^{18}\text{O}_2$ geben Auskunft über die Herkunft des Sauerstoffs in funktionalisierten Carotininen [13, 14, 15].

3.2.1. Experimente mit Deuterium

Wie schon erwähnt, wird die Ringschlussreaktion bei C_{40} -Carotininen durch einen elektrophilen Angriff eines Protons auf das C(2) der 1, 2-Doppelbindung des offenkettigen Vorläufers eingeleitet und durch Teilnahme der C(5)-C(6)-Doppelbindung abgeschlossen. Dabei entsteht ein prochirales Zentrum an C(2). Seine Konfiguration wurde an Zeaxanthin aus einer *Flavobacterium sp* folgendermassen ermittelt [16]:

Die Autoren kultivierten eine *Flavobacterium*-Mutante, *R1519*, in Gegenwart des Cyclisationshemmers Nicotin. Dann wurde auf (Nicotin freies) D_2O umgestellt. Das accumulierte Lycopin cyclisierte sich nun mit dem Deuteron als auslösendem Elektrophil. Die NMR-Untersuchung des biosynthetisierten Zeaxanthins (**1a**) ergab die relative Stereochemie an C(2) und C(3): D - C(2) und OH - C(3) stehen cis zueinander. Da das deuterierte Zeaxanthin dieselbe Konfiguration an C(3) aufweist wie das nicht deuterierte, folgt daraus die absolute Konfiguration an C(2). Daraus folgerten die Autoren, dass der Angriff des Protons bzw. Deuterons an der re-Seite von C(2) der 1, 2-Doppelbindung erfolgt; s. Fig. 1.

Damit lassen sich Reaktionswege über S(1) und W(1) ausschliessen; s. Schema 3 & 4.

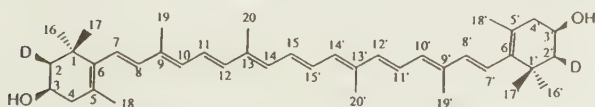


Fig 1. biosynthetisiertes Zeaxanthin **1a**

In einem ähnlichen Experiment mit *Scenedesmus obliquus*, Mutante *PGI* hat Britton [17, 18] auch die Prochiralität von C (2') in Lutein (**2a**) aufgeklärt.

Diese Mutante accumuliert in Vergleich zum Wildtyp acyclische Vorläufer (Phytoin und hauptsächlich ζ - Carotin) im Dunkeln [17]. Es werden unter dieser Bedingung keine der üblicherweise vorkommenden Carotine, nämlich α -, β - Carotin, Lutein, Violaxanthin, Neoxanthin und Loroaxanthin gebildet. Umstellen der Kultur auf D₂O und anschließende Beleuchtung führte dann zur Cyclisation der accumulierten acyclischen Vorläufer. Die NMR-Untersuchung von Lutein zeigte, dass die Stereochemie von D-C(2) und H-(3) wieder cis ist und somit derjenigen am β - Ring von Zeaxanthin (Fig. 1) entspricht; s. Fig. 2.

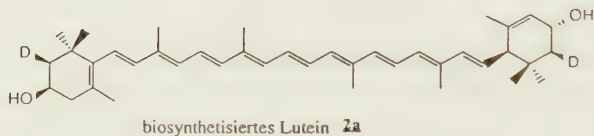


Fig. 2. Absolute Konfiguration an C(2) und C(2') (Erweiterung dieses Experimentes siehe Abschnitt 3.2.2.)

Aus diesen zwei Experimenten kann man schliessen, dass unabhängig vom gebildeten Produkt der elektrophile Angriff an Zentrum C(1) von der si-Seite und der nucleophile Angriff an Zentrum C(2) von der re-Seite erfolgt.

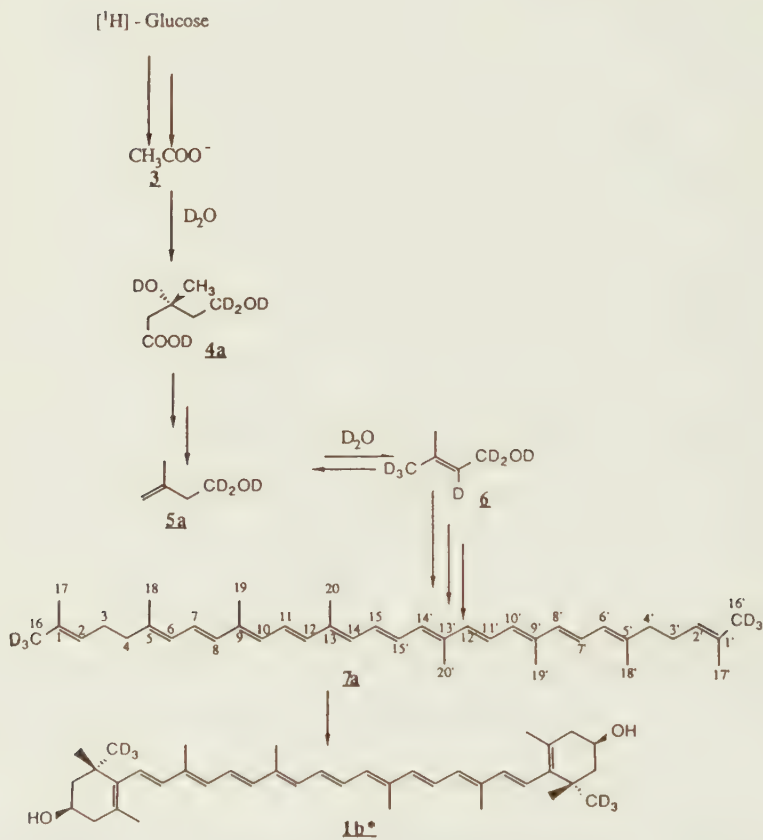
3.2.1.1. Incubation mit [^1H] - Glucose in D_2O ; s. Schema 5

In diesem Versuch züchtete Britton laut einem Vortragsbericht [12] *Flavobacterium R1519* in D_2O im Gegenwart von [^1H]-Glucose. MVA (**4a**), die unter diesen Bedingungen gebildet wurde, zeigte eine Deuteriumanreicherung nur an C(5). Das bedeutet, dass das Medium D_2O weder einen Einfluss auf die Acetoacetyl-CoA-Synthese noch auf die HMG-Synthese hat. Es wirkt sich erst auf die Reduktion von HMG-CoA zu Mevalonsäure aus sowie natürlich auf den Austausch der sauren OH-Gruppen. C(2) und C(4) der MVA werden in der nachfolgenden Isomerisierung $\text{IPP} \rightleftharpoons \text{DMAPP}$ in einem schnellen Gleichgewicht deuteriert. Dabei blieb die C(3') Methylgruppe (die in DMAPP (Z)-ständig ist) vom Austausch verschont; s. Schema 5. Unter Hemmung durch Nicotin gebildetes Lycopin zeigte die Markierung an der (E) - Methylgruppe, d. h. an C(16). Auswaschen von Nicotin aus dem Kulturmedium führte zur Bildung von cyclischen Carotininen, vor allem von Zeaxanthin (**1b**).

Das ^1H -NMR Spektrum des Diacetates von biosynthetischem Zeaxanthin zeigte, dass die ehemalige (E)- ständige Methylgruppe des Lycopins nun in der ψ -axialen Stellung an C(1) von **1b**, d.h. an C(16) und C(16') erscheint. Damit ist auch bewiesen, dass die ψ -equatorialen Methylgruppen, C(17) und C(17'), aus der C(3') - Methylgruppe der MVA stammen.

Zusammen mit den vorher beschriebenen Experimenten im gleichen Organismus ergibt sich:

Ehemaliges Elektrophil, d.h. pro (R)-H-C(2) und CH_3 (17) stehen im β -Ring trans zueinander; das bedeutet, die overall-Addition an die C(1) - C(2) Doppelbindung ist trans.



Schema 5

*) zusätzliche Markierung an der erwarteten Stelle

3.2.2. Incorporationsexperimente mit ^{13}C -Vorläufern

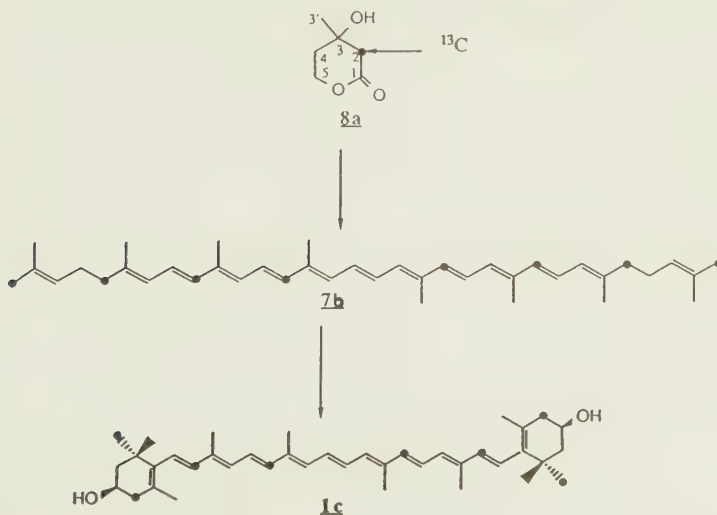
3.2.2.1. Einbau von $[2-^{13}\text{C}]$ -MVA; s. Schema 6

Britton et al. [19] benutzten auch ^{13}C anstelle von Deuterium um das stereochemische Verhalten der beiden endständigen Methylgruppen während des Cyclisationsschrittes zu untersuchen. Sie verwendeten $[2-^{13}\text{C}]$ -MVA (**8a**) als Carotinvorläufer.

Zuerst kultivierten sie *Flavobacterium R1560* in Anwesenheit des Cyclisationshemmers und von $[2-^{13}\text{C}]$ -MVA. Das biosynthetisierte Lycopin zeigte im NMR-Spektrum eine Anreicherung von ^{13}C am C(4, 4'), C(8, 8'), C(12, 12') und C(16, 16'); s. Schema 6. Damit ist erneut bewiesen, dass die C-Atome 2 und 3' der MVA ihre Identität bewahren bis sie als C(16, 16') und C(17, 17') im Lycopin erscheinen.

Unter normalen Bedingungen, nämlich ohne Gegenwart von Nicotin, wurde das exogene $[2-^{13}\text{C}]$ -MVA mit einer ^{13}C -Anreicherung von 3-4% in die erwarteten Positionen des Zeaxanthins (**1c**) eingebaut. Das ^{13}C -NMR Spektrum zeigte, dass die (E)-ständige Methylgruppe des Lycopins nun in C(16) und C(16') des Produktes erschien.

Diese Experimente zeigen, dass die (E)-ständige terminale Methylgruppe des Vorläufers bei der Cyclisierung in die pro-(S)-Position(C(16,16')) im Zeaxanthin gelangt. Das entspricht der Faltung S(2) oder W(2).



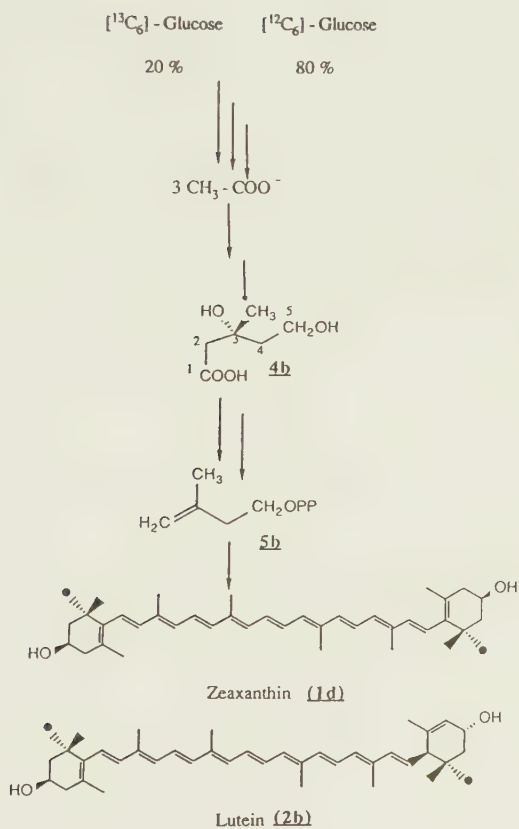
Schema 6: Einbau von $[2-^{13}\text{C}]$ -MVA

3.2.2.2. Arbeiten mit [$^{13}\text{C}_6$]-Glucose; s. Schema 7

In diesem weiteren Versuch von Britton et al., mitgeteilt in einem Vortrag [12], diente die Glucose als endogener Vorläufer, aus welchem Acetat gebildet und später nach dem Prinzip $\text{Glucose} \longrightarrow \text{Acetat} \longrightarrow \text{MVA}$ ins Carotin eingebaut wird; s. Schema 7. Man fütterte die untersuchten Organismen (*Flavobacterium R1560* bzw. *Scenedesmus obliquus*) mit 20% [$^{13}\text{C}_6$]-Glucose und 80% [^1H]-Glucose. Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei benachbarte Acetateinheiten markiert sind, beträgt 4%. Ein C-Atom geht bei der Bildung von IPP verloren, was zur Folge hat, dass vier der fünf C-Atome aus zwei intakten Acetateinheiten entstehen. Das fünfte C-Atom, welches dem C(2) der MVA entspricht, wird somit keine ^{13}C - ^{13}C Kopplung zeigen. Damit kann man das Schicksal von C(2) der MVA anhand der unterschiedlichen Kopplungsmuster im ^{13}C -NMR-Spektrum im isolierten Produkt feststellen.

Zeaxanthin (**1d**), aus der [$^{13}\text{C}_6$]-Glucose-Incubation im *Flavobacterium* isoliert, zeigte, dass die ψ -axiale Methylgruppen, also C(16) und C(16') markiert waren.

Das Hauptcarotinoid, Lutein (**2b**), aus *Scenedesmus obliquus* zeigte die gleiche ^{13}C -Anreicherung wie beim β -Ring, nämlich wiederum in der axialen Methylgruppe $\text{CH}_3(17')$. Damit ist bewiesen, dass die Stereochemie der Addition an die 1, 2-Doppelbindung bei der Bildung des β - und ϵ -Ringes dieselbe ist.

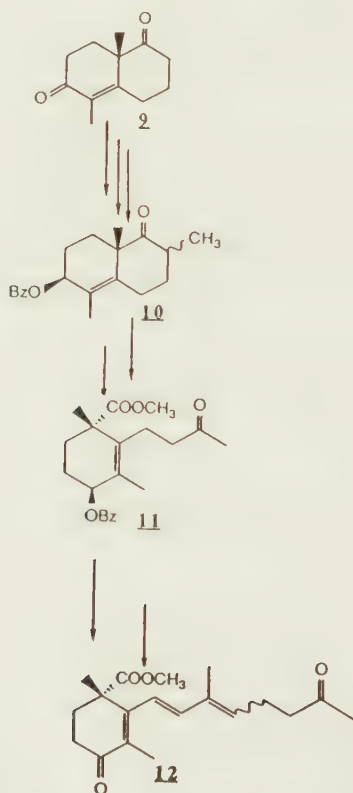


Schema 7: Einbau mit $[^{13}\text{C}_6]$ -Glucose

4. INCORPORATIONSVERSUCHE MIT RADIOISOTOP MARKIERTENVORLÄUFERN

4.1. Einbau von $[2-^{14}\text{C}]$ - MVA ; s. Schema 9

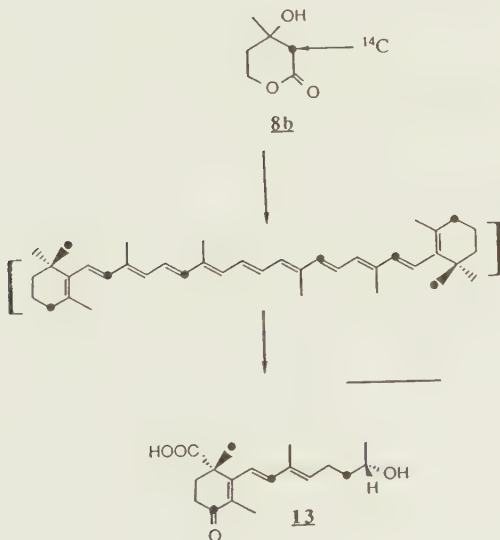
Trisporsäure (**13**), aus *Blakeslea trispora* ist ein Abbauprodukt von β, β - Carotin. Die absolute Konfiguration von C(1) wurde von Bu' Lock, Snatzke et al. [20, 21] durch CD - Vergleich mit bekannten Steroiden und durch $^1\text{H-NMR}$ Argumente als (1S) vorgeschlagen. Kürzlich wurde diese Zuordnung von Takahashi et al. [22] durch eine enantioselektive Synthese bestätigt. Ausgehend vom (+) - Decalinderivat **2**, welches an C(10) dieselbe Konfiguration (1S) wie die Trisporsäure besitzt, wurde der Methylester von (+)-(7E, 9Z)-Trisporsäure B (**12**) und sein (9E)-Isomer synthetisiert. Diese Synthese ist in Schema 8 dargestellt.



Schema 8

Bu'Lock und Mitarbeiter [20, 21] incorporierten $[2-^{14}\text{C}]$ -MVA, (**8b**) mit einer Einbaurate von 0, 65% im Trisporsäure; s. Schema 9. Die ^{14}C - Markierung der MVA erscheint in der (E)-Methylgruppe, C(16), von Lycopin; s. Abschnitt 3.2.2.1.

Hydrierung der Seitenkette und Decarboxylierung mit methanolischer KOH ergab CO_2 , welches als BaCO_3 abgefangen wurde und 1, 4% $\pm 0, 1\%$ der totalen Aktivität aufwies. Das heisst, dass nach der Cyclisierung die Markierung an der Methylgruppe von C(1) der Trisporsäure sitzt. Dies lässt auf Faltungen S1 (E) oder W1 (E) oder S1 (Z) oder W1 (Z) des Vorläufers schliessen. Dieses Resultat steht im Widerspruch zu demjenigen von Britton [19].



Schema 9: Einbau von $[2-^{14}\text{C}]$ -MVA

4.2. Zusammenfassung der Resultate von Incorporationsversuche

1. Die Identität der Methylgruppen am C(1) der Lycopin bleibt während der Cyclisierung erhalten.
2. Im Cyclisationsprodukt stehen das ehemalige Elektrophil und die ehemalige (E)-Methylgruppe des Vorläufers trans zueinander.
3. Die Bildung des β - und ϵ -Rings verläuft über denselben Additionsmodus an die 1, 2 - Doppelbindung des Lycopins, nämlich 1si, 2re.
4. Die Faltung des Vorläufers zur Bildung des β -Rings kann entweder der Konformation S2 (E), W2 (E), S2 (Z) oder W2 (Z) entsprechen, jedoch muss sie bei der Bildung des ϵ -Rings W2 (Z) sein, denn die absolute Konfiguration von C(6) aller Carotinoide mit ϵ -Ring aus höheren Pflanzen ist einheitlich (R).
5. Die Stereochemie der Ringschlussreaktion zur Bildung der β - & ϵ - Ringe ist in Bakterien und Algen gleich. Jedoch blieb bis heute offen, ob die Ringschlussreaktion bei höheren Pflanzen mit gleicher Stereochemie abläuft.

Bis heute blieben folgende Fragen offen:

- Es fehlen Experimente zur Bildung der γ - Endgruppe;
- Es wurden keine Informationen über die Konfiguration der 5, 6-Doppelbindung des offenkettigen Vorläufers gewonnen, was eine entscheidende Rolle bei der Ringschlussreaktion spielen kann; siehe [7, 8, 11];
- auch blieb die Frage offen, ob die Bildung der Ringe an den Enden des offenkettigen Vorläufers gleichzeitig oder in zwei getrennten Schritten stattfindet. Für eine konsekutive Bildung spricht das verbreitete Vorkommen von monocyclischen Carotinoiden;
- Es ist nicht bekannt, ob bei der Bildung von β , ϵ , γ - Endgruppen ein oder mehrere Enzyme beteiligt sind.

4.3. Bisherige biologische Cyclisierungen an markierten Lycopinen

Der Nachweis, dass Lycopin der direkte Vorläufer der cyclischen Carotine ist, wurde meist mit Hilfe von Inhibitoren (Nicotin [4, 5] oder CPTA [6]) erbracht. Dabei wurde [^{14}C]-MVA oder [^{14}C]-Acetat incorporiert und gezeigt, dass in Gegenwart des Inhibitors Lycopin accumulierte, das sich nach dem Auswaschen des Inhibitors cyclisierte.

Batra et al. [23, 24] sowie Britton und Mitarbeiter [25, 26, 27, 28] untersuchten die Wirkungsweise der verwendeten Inhibitoren auf die Bildung von cyclischen Carotinoiden in *Mycobacterium* bzw. *Rhodospirillum rubrum* und *Flavobacterium*. CPTA war ein ca. 100mal stärkerer Hemmer der Carotincyclisation als Nicotin. Weiterhin wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass beide Inhibitoren nicht die Synthese der Cyclasen hemmen, sondern nur deren Aktivität herabsetzen.

Decker und Uehleke [29] waren die ersten, welche die direkte Incorporation von [^{14}C]-Lycopin in β , β -Carotin in einem zellfreien Extrakt aus Rinden und Karottenblättern nachgewiesen haben. Das hier eingesetzte [^{14}C]-Lycopin wurde aus [^{14}C]-Acetat durch Incubation mit Tomatenstücken hergestellt und daher unspezifisch markiert. Die Reinigung des biosynthetisierten β , β -Carotins wurde durch Kristallisation bis zur konstanten spezifischen Aktivität vorgenommen. In den Versuchen mit Chloroplasten wurde jedoch nur eine sehr geringe Aktivität im gebildeten β , β -Carotin festgestellt.

Porter und Mitarbeiter [30, 31, 32] haben den Einbau von synthetischem [^{15}N , ^{15}N]-Lycopin in α -, β -, δ - und γ -Carotin mit Hilfe von Spinat-Chloroplasten und eines "Acetonpulvers" aus Tomaten veröffentlicht. Unter optimalen Bedingungen gelang den Autoren eine Incorporation von [^{15}N , ^{15}N]-Lycopin in β , β -Carotin mit einer Einbaurate von höchstens 8%. Der Nachweis von isolierten biosynthetisierten Carotinoiden wurde durch Co-Chromatographie mit authentischen Carotinoiden, Kristallisation bis zur konstanten spezifischen Aktivität, UV/VIS und schliesslich durch die Gaschromatographie der Perhydrocarotine durchgeführt.

Später haben Papastefanou et al. [33] den Einbau von Lycopin in cyclische Carotine in genetisch unterschiedlichen Tomaten-Cultivaren durchgeführt. In zwei Sorten, nämlich "Tangerine" und "Verker's 377-2aa", wurde nur die Bildung von β -Ring beobachtet.

Aus dieser Beobachtung haben Porter et al. geschlossen [32], dass an der Bildung von β - und ϵ -Ring zwei getrennte Enzymsysteme beteiligt sind.

Hill et al. [34] haben die Incorporation von [$^3\text{H}_2$]-Lycopin in β , β -Carotin mit Extrakten aus Plastiden aus Keimlingen von *Phaseolus vulgaris* (French bean) oder aus Tomaten beschrieben. Das hier verwendete Lycopin wurde durch die Incubation mit [$2\text{-}^{14}\text{C}$]-MVA und [$2\text{-}^3\text{H}_2$]-MVA in Tomatenfrüchten gewonnen. Die Einbaurate betrug dabei 12, 9% im Fall von French bean und 7% im Fall von Tomatenfrüchten. Zum Nachweis der biosynthetisierten Carotinen wurde Dünnschichtchromatographie mit anschließender Autoradiographie und Kristallisation bis zur konstanten spezifischen Aktivität verwendet.

In einer neueren Arbeit berichteten Camara et al. [35] über die Cyclisierung von [$15,15\text{-}^3\text{H}_2$]-Lycopin in β , β -Carotin mit guter Einbaurate in einer Chromoplastmembranfraktion aus *Capsicum*-Früchten. Das biosynthetisierte β , β -Carotin wurde mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie und weiter mit HPLC gereinigt. Die Radioaktivität wurde auch in einem Derivat, Canthaxanthin, nachgewiesen. Durch weitere Experimente haben die Autoren gefunden, dass Lycopincyclase ein integrales Membranprotein ist.

Cyclisierungen in Mikroorganismen wurden hauptsächlich bei Phycomyceten und Flavobacterien untersucht.

Incorporationsversuche mit [^{14}C]-Lycopin, [^{14}C]- γ -Carotin und [^{14}C]-Neurospurin wurden in einem zellfreien System der Mutante C 115 car-42 mad-107 (-) von *Phycomyces Blakesleeana* in [36] durchgeführt. Die Substrate wurden biosynthetisch hergestellt (unspezifisch markiert) und mit einer Einbaurate von 3, 6% ([^{14}C]-Lycopin), 5, 4% ([^{14}C]- γ -Carotin) und 6, 9% ([^{14}C]-Neurospurin) in β , β -Carotin eingebaut.

Britton und Mitarbeiter [37] berichteten über den Einbau von [^3H]-Lycopin in β , β -Carotin und Zeaxanthin in einem zellfreien System aus *Flavobacterium R1560*. In dieser Arbeit wurden weder über die Herkunft des eingesetzten Vorläufers noch über die Einbaurate und die Reinigungsmethoden Angaben gemacht.

Später haben Brown und Britton [38] den Einbau von [$15,15'\text{-}^3\text{H}_2$]-Lycopin in β , β -Carotin mit einem zellfreien System aus *Flavobacterium R1560* erreicht. Um den Einbau von Lycopin in β , β -Carotin zu bestätigen, wurde das biosynthetisierte β , β -Carotin zu Canthaxanthin oxidiert. Dabei blieb die spezifische Aktivität unverändert.

In diesem Abschnitt wurde gezeigt, dass es biologische Systeme gibt, welche in der Lage sind, exogenes Lycopin in cyclische Carotine einzubauen. Es ist zu bemerken, dass alle diese Versuche mit radioaktiv markierten Vorläufern durchgeführt wurden, d.h. wenig biosynthetisierte Substanz wurde gebraucht um die Einbaurate zu bestimmen. Zur Bestimmung des stereochemischen Verlaufs der Reaktion muss aber mit stabilen Isotopen markiert werden, wodurch eine starke Vergrößerung der Mengen erfordert wird. Dies erwies sich in der Praxis als schwierig.

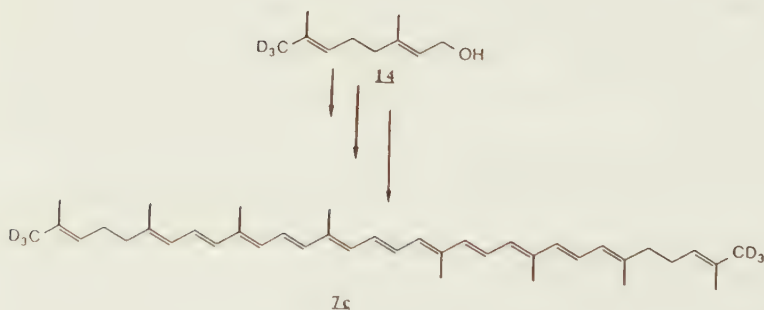
Ausserdem ist auch bekannt, dass Biosyntheseveruche ohne Reinigung über Derivate und ohne Abbau der radioaktiven Produkte ohne Aussagewert sind.

Bis jetzt ist es nicht gelungen, das Enzym "Cyclase" zu isolieren, zu reinigen und zu charakterisieren.

5. BISHER CHEMISCH SYNTHETISIERTE DEUTERIERTE SUBSTRATE UND MODELLVERBINDUNGEN

5.1. Synthese von $[16,16,16, 16',16',16'-^2\text{H}_6]$ -Lycopin; s. Schema 10

In Kapitel 4.3 wurde gezeigt, dass es gelungen ist, Lycopin mit enzymatischen Systemen in cyclische Carotine überzuführen, wobei gleichzeitig bewiesen wurde, dass die Individualität der endständigen Methylgruppen erhalten bleibt. Demnach muss die biologische Cyclisierung eines selektiv an C(16) oder C(17) markierten Lycopins zu einem Chiralitätszentrum an C(1) des Produkts führen. Falls dessen Chiralität bestimmt werden kann, lassen sich ebenfalls Rückschlüsse auf die Konformation der Faltung des Vorläufers ziehen. In Hinblick auf dieses Ziel hat Hofer [10, 39] einerseits selektiv deuteriertes $[16,16,16, 16',16',16'-^2\text{H}_6]$ -Lycopin (**7c**) (Schema 10) synthetisiert und vollständig charakterisiert und Märki [9, 40] hat andererseits die Chiralität an C(1) von selektiv deuterierten Carotinen bestimmt; s. Abschnitt 5.2.

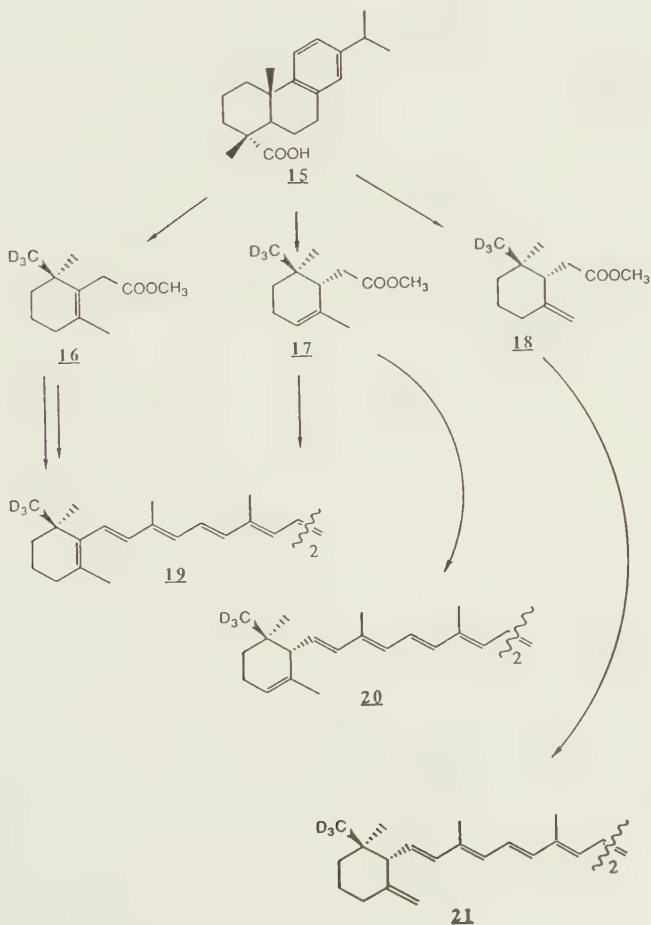


Schema 10: Synthese von $[^2\text{H}_6]$ -Lycopin

5.2. Synthese und Identifizierung von stereospezifisch markierten

[16,16,16, 16',16',16'-²H₆] -β-, β-, β-, ε-, und γ, γ- Carotinen

Um die Chiralität an C(1) von cyclischen Carotinoiden aus biosynthetisiertem [²H₆] - Lycopin zu erkennen, muss die absolute Konfiguration des entsprechenden Ringes bekannt sein. Deshalb hat Märki [9, 40] optisch aktive [16R, 16'R-²H₆]- β-, β-, ε-, ε- und γ,γ- Carotine (**19**, **20**, **21**) aus den deuterierten Homocyclogeranium-säureestern **16**, **17**, **18** synthetisiert. Diese Endgruppen liessen sich aus Abietinsäure (**15**) mit bekannter Konfiguration am C(1) herstellen; s. Schema 11 .



Schema 11

Die optisch aktiven Carotine; s. Fig. 3, liessen sich mit Hilfe von spektroskopischen und chiroptischen Methoden charakterisieren. Der Ersatz einer der beiden Methylgruppen durch eine CD_3 -Gruppe führt im β , β -Carotin zu einem Chiralitätszentrum, welches bei tiefer Temperatur einen messbaren CD-Effekt gibt; s. Fig. 3.

Hingegen können die diastereotopen Methylgruppen an den ϵ - und γ -Endgruppen mit NMR-Spektroskopie unterschieden werden.

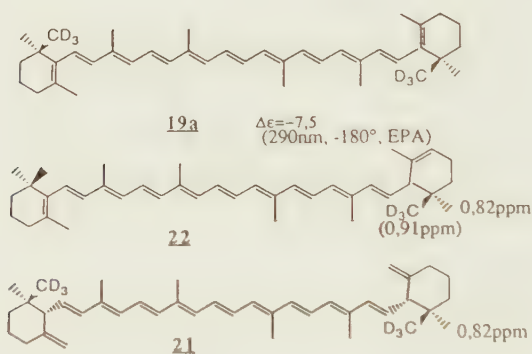


Fig 3

6. EIGENE ARBEITEN I: SYNTHESSEN

6.1. Zielsetzung und Verlauf der Arbeit

Die Experimente von Britton et al. [19] und von Bu'Lock und Mitarbeitern [20, 21] führten zu widersprüchlichen Resultaten über die Stereochemie der Ringschlussreaktion bei Carotinen (s. Abschnitt 3.2. und 4.1.).

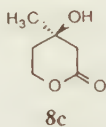
Das erste Ziel unserer Arbeit bestand darin, durch einen unabhängigen Weg eines der beiden Resultate zu bestätigen. Zu diesem Zweck sollte das von Hofer synthetisierte Lycopin [10, 39] in eines der in der Literatur (Abschnitt 4.3.) beschriebenen enzymatischen Systeme eingesetzt werden. Weil dies lange Zeit nicht mit genügenden Einbauraten gelang, wurde versucht, wasserlösliche Vorläufer einzubauen. Im als Produkt aus dem Einbau von $[^2\text{H}_6]$ -Lycopin erwarteten $[^2\text{H}_6]$ - β , β -Carotin lässt sich die absolute Konfiguration nur durch CD-Spektroskopie und Vergleich mit den Daten von Märki [9, 40] ermitteln. Das setzt relativ hohe Einbauraten voraus.

Daraus ergab sich das zweite Ziel der vorliegenden Arbeit: die Synthese der $[^2\text{H}_3]$ -C(3')-MVA und deren Einbau in cyclische Carotine. Das Resultat aus dem Einbau von $[^2\text{H}_3]$ -C(3')-MVA ergibt keine Aussage über die Stereochemie des Vorläufers. Deshalb mussten entsprechende Vorläufer synthetisiert werden, in denen die Stereochemie der 5, 6-Doppelbindung definiert war.

Eine stereoselektive Synthese von GPP, FPP und GGPP, in denen eine der beiden endständigen Methylgruppen markiert ist, kann die gestellten Bedingungen erfüllen (Unter der Voraussetzung allerdings, dass bei der Dehydrierungsreaktion, die vom Phytoin zum Lycopin führt, keine Isomerisierung der 5, 6-Doppelbindung stattfindet!). Da nicht bekannt war, welches der Isoprenylpyrophosphate die beste Einbaurate ergeben würde, wurden alle drei Verbindungen hergestellt.

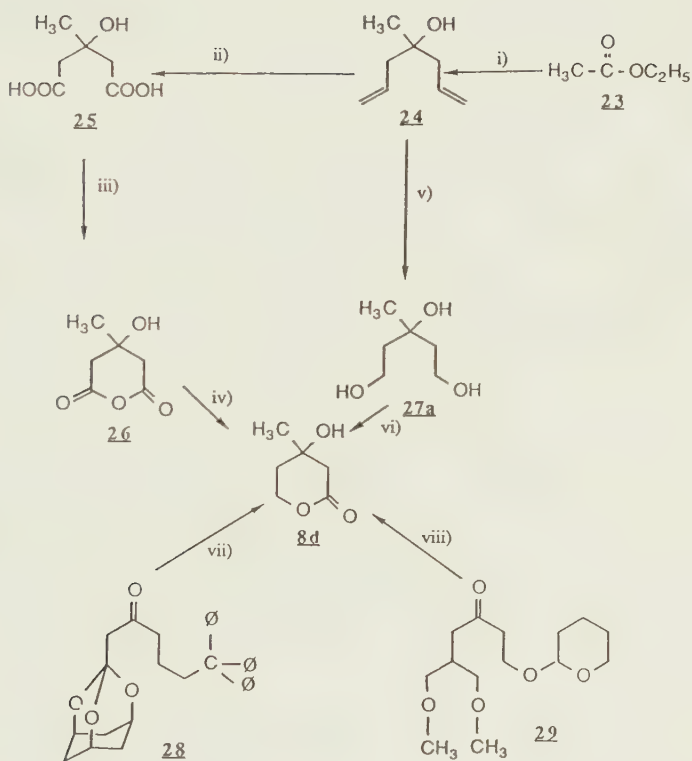
6.2. Bisherige Synthesen von rac., an C(3')-markiertem Mevalolacton

MVA (**8c**) spielt eine zentrale Rolle in der Biogenese von isoprenoiden Naturstoffen. Es ist bewiesen, dass nur eine der enantiomeren Formen, die (R)-Form, biologisch wirksam ist [41]. Daher kann für Incorporationsversuche das Racemat eingesetzt werden; eine Synthese der optisch aktiven Verbindung erübrigt sich.



Da die C-(3')-Methylgruppe von MVA einer der beiden geminalen Methylgruppen in Carotinen entspricht, kann die Markierung dieser Methylgruppe mit geeigneten Isotopen mit anschließender Incorporation in cyclische Carotine zur Aufklärung der Ringschluss-Stereochemie beitragen.

Es sind in der Literatur einige Synthesewege zur Herstellung an C-(3') spezifisch markierter (RS)-MVA beschrieben; s. Schema 12.



Schema 12

- i) $\text{C}_2\text{H}_5\text{MgBr}/\text{Et}_2\text{O}:\text{THF}(1:2)$
- ii) $\text{O}_3/\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}_2$
- iii) $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Pyridin}$
- iv) NaBH_4 in Propanol
- v) $\text{O}_3/\text{LiAlH}_4$

- vi) Ag_2CO_3 in Benzol
- vii) CH_3MgI , $\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}$
- viii) CH_3MgI , $\text{Br}_2/\text{H}_2\text{O}$

Scott et al. [42] benutzten Ethylacetat (**23**), als markierte Schlüsselverbindung. Reaktion von **23** mit Allylmagnesiumbromid lieferte den Dienalkohol **24**. Anschliessende Ozonolyse und oxidativer Abbau mit Essigsäure und Wasserstoffperoxid gab die Disäure **25**. Reaktion von **25** mit einem Ueberschuss von Essigsäureanhydrid ergab das Anhydrid **26**, mit guter Ausbeute. Das gewünschte [$3\text{'-}^{13}\text{C}$]-MVA wurde nun mit einer gesamten Ausbeute von 58% durch die Reduktion von **26** mit NaBH_4 in Isopropanol erhalten. Später haben Lewer et al. [43] diesen Syntheseweg ausführlich untersucht.

In einem komplementären Weg synthetisierten Fétizon et al. [44] das gewünschte Produkt **8d** via 3-Methyl-pentan-1, 3, 6-triol (**27a**). Hier wird die Lactonbildung mit Ag_2CO_3 / Celite erzielt.

Im allgemeinen wird in der Synthese radioaktiver Verbindungen die Einführung der Markierung in der letztmöglichen Stufe vorgenommen.

Rousseau und Mitarbeiter [45] haben eine zweistufige Synthese für **8d**, beschrieben. Im ersten Schritt addierten sie markiertes Methylmagnesiumiodid mit 1-(2,4,10-Trioxaadamantyl)4-trityloxy-2-butanon (**28**). Saure Hydrolyse des gebildeten Produkts lieferte das Produkt **8d** mit einer gesamten Ausbeute von 37%.

Im zweiten Weg stellte das 1,1-Dimethoxy-5-(2-tetrahydropyranloxy)-3-pentanon **29** das Ausgangsmaterial dar. Addition von Methylmagnesiumbromid mit anschliessender oxidativer Hydrolyse mit $\text{Br}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}$ ergaben das Produkt mit einer gesamten Ausbeute von 40%.

Zur Darstellung von $[^2\text{H}_3]\text{-C}(3')\text{-MVA}$ (**8e**) erwies sich ein analoges Vorgehen zur Synthese von nicht markierter MVA nach [46] am besten (Günstige Ausbeute, späte Einführung der Markierung, einfache Edukte); s. Schema 13.

Die Autoren [46] konnten die schwierige Umwandlung von Triol **27a** in MVA mit Pyridiniumchlorochromat (PCC) oder mit (BiPy) H_2CrOCl_5 in Dichloromethan bei RT unter wasserfreien Bedingungen in das gewünschte Lacton erzielen. Zusätzlich entwickelten sie eine sehr einfache Synthese für das Triol **27a**; s. Schema 13.

Die Schlüsselverbindung **34** zur Einführung der Markierung an C-(3) wurde in vier Schritten hergestellt.

Die Ketofunktion von Acetondicarbonsäurediethylester (**30**) wurde als Hemithioacetal **31** geschützt. Anschliessende Reduktion von **31** und Schutz der primären Hydroxylgruppe mit Dihydropyran ergab das Produkt **33**. Nun konnte die Hemithioacetalgruppe mit Quecksilber(II)chlorid und Calciumcarbonat selektiv entfernt werden.

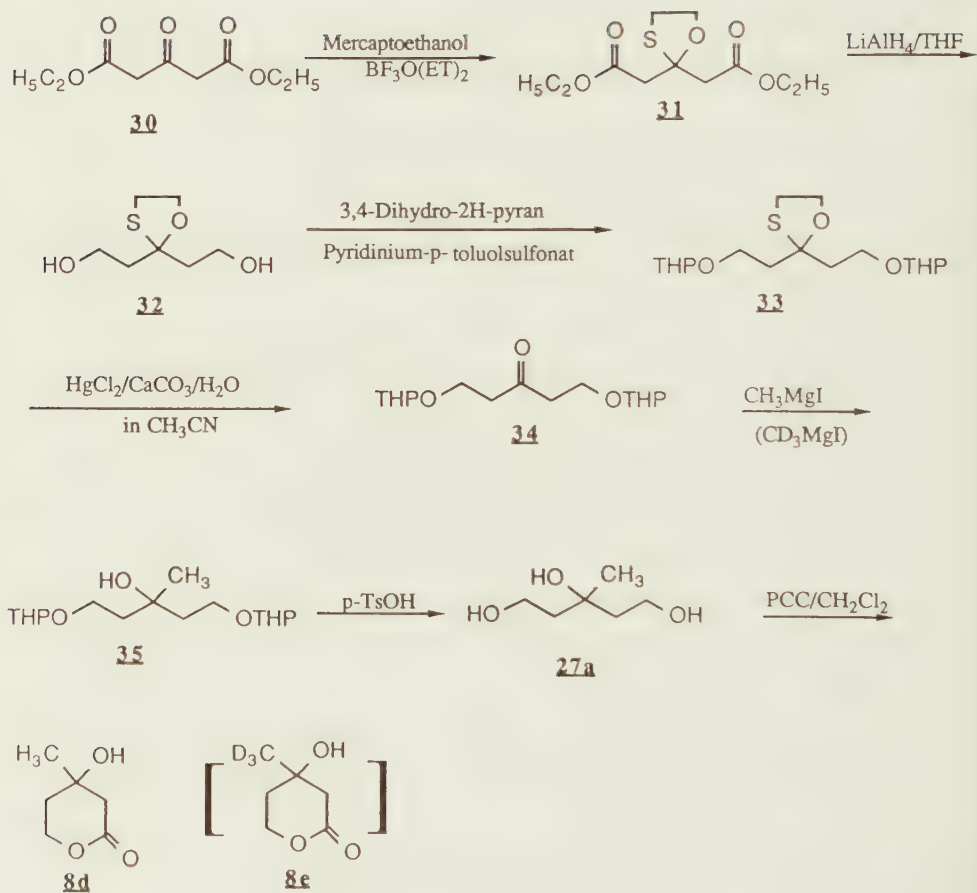
Grignard-Reaktion von **34** mit Methylmagnesiumiodid und anschliessende Abspaltung der Schutzgruppe lieferten das Produkt **27a** mit guter Ausbeute. Die Autoren gaben für den letzten Schritt der Synthese, die PCC-Oxidation von **27a**, 92 % Ausbeute an.

Wir gingen von Acetoncarbonsäuredimethylester aus und erhielten **34** genau analog [46]. Der Umsatz mit CD_3MgI und Abspaltung der Schutzgruppe führten zum erwarteten deuterierten Triol **27b**.

Jedoch konnten wir den nachfolgenden Schritt mit der angegebenen Ausbeute (92%) nicht reproduzieren. Variationen der Oxidationsbedingungen ergaben höchstens 50 % Ausbeute.

Das Zielprodukt **8e** wurde schliesslich durch Oxidation mit Ag_2CO_3 / Celite nach Fétizon et al. [44] mit einer Ausbeute von 70% erhalten. Seine spektralen Eigenschaften stimmen mit den in der Literatur beschriebenen Daten für die nicht markierte Verbindung überein.

Im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum fehlte das Signal für die Methylgruppe C-(3'); im IR erscheint eine leicht erkennbare Bande bei 2400 cm^{-1} .



Schema 13 aus [46]

6.3. Stereoselektive Synthesen von an der (E)-Methylgruppemarkiertem

Isoprenoid-diphosphorsäureestern

Wie in der Zielsetzung erwähnt, war das Ziel die Synthese der wasserlöslichen Isoprenoidpyrophosphate DMAPP, GPP, FPP und GGPP, welche an je einer der endständigen Methylgruppen mit Deuterium markiert waren.

In diesem Abschnitt werden zunächst die Möglichkeiten der Funktionalisierung der Methylgruppen der Isopropyliden-Endgruppe kurz erläutert (vgl. [10]).

1. Die etablierte Methode der stereospezifischen Oxidation der (E)-ständigen allylischen Methylgruppe benutzt SeO_2 [47, 48, 49, 50]. In neueren Arbeiten sind modifizierte Bedingungen für diese Reaktion beschrieben [51, 52].
2. Die Funktionalisierung kann ebenfalls über einen Phenylsulfenylchlorid-Komplex erzielt werden [53].
3. Mit der Wittig-Schlosser-Reaktion ("SCOOPY") haben Taylor et al. [54] das Äthylenketal von 4-Oxo-pentanal funktionalisiert und eine (Z)-Selektivität erreicht.
4. Es sind auch biologische Funktionalisierungen der Isopropyliden-Endgruppe in der Literatur beschrieben [55].
5. Weitere Möglichkeiten sind erwähnt in [10].

Bei allen diesen Methoden muss die Einführung von Deuterium in die Methylgruppe über mindestens drei Stufen durchgeführt werden. Dies kann zu einem nicht 100-prozentigen Deuterierungsgrad führen.

Deshalb wurde in unserer Synthese versucht, die Einführung der CD_3 -Gruppe in einem Schritt nach der Methode von Corey et al. [56] zu vollziehen. Eine andere Möglichkeit ist in [57], [58] beschrieben; sie wurde von uns nicht benutzt.

6.3.1. Synthese von C₅-, C₁₀-, C₁₅- und C₂₀- [²H₃]-markierten Polyprenolen (Dimethylallylalkohol, Geraniol, Farnesol, Geranylgeraniol)

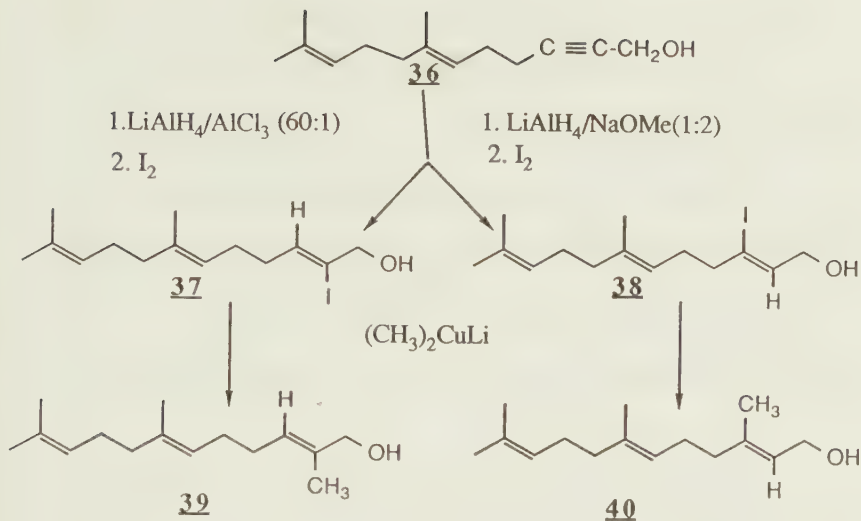
6.3.1.1. Synthesekonzept

Wie in der Zielsetzung dieser Arbeit erwähnt wurde, sind wir zur Synthese von wasserlöslichen Carotinoidvorläufern übergegangen. Als solche sind die Isoprenoidpyrophosphate sehr geeignet. Da der Einfluss der Kettenlänge solcher Vorläufer auf die Zugänglichkeit in der Zelle bzw. auf der Enzymfläche nicht bekannt ist, haben wir die Synthese von allen vier Isoprenoidalkoholen ausgeführt.

Unser Synthesekonzept gründet auf der Arbeit von Corey et al. [56]. Die Grundidee bei dieser Synthese ist, dass Vinylhalide mit Lithium-dimethylcupraten alkyliert und die benötigten Vinylhalide durch Reduktion von Propargylalkoholen mit LiAlH₄/I₂ stereospezifisch hergestellt werden; s. Schema 14.

Reduktion von Propargylalkohol **36** mit LiAlH₄/AlCl₃ (60:1) in THF ergab einen Organoaluminiumkomplex, welcher mit überschüssigem I₂ bei - 78⁰ den (Z)-β-Iodoalkohol **38** lieferte.

Unter gleichen Bedingungen, jedoch mit LiAlH₄/NaOMe (1:2) als Reduktionsmittel erhielten die Autoren den isomeren α-Iodo-alkohol **37**. Anschliessende Alkylierung von **37** oder **38** ergab (E, E)- 2, 7, 11-Trimethyl-2, 6, 10-dodecatrien-1-ol (**39**) bzw. (E, E)-Farnesol (**40**).

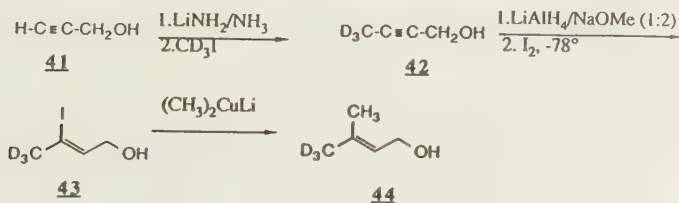


Schema 14

6.3.1.2. Durchführung der eigenen Synthese; s. Schema 15

Propinol (**41**) wurde mit $\text{LiNH}_2/\text{NH}_3$ fl. deprotoniert und anschliessend mit CD_3I zu **42** alkyliert. Nach stereospezifischer Reduktion von **42** mit $\text{LiAlH}_4/\text{NaOMe}$ (1:2) und Reaktion mit I_2 wurde **43** erhalten. Die darauf folgende Alkylierung mit Dimethylcuprat gab regio- und stereospezifisch den Dimethylallylalkohol **44**.

Nach Schema 15 kann die Einführung der CD_3 -Gruppe gezielt im ersten oder im letzten Schritt der Synthese durchgeführt werden. So kann man auch das gewünschte Produkt wahlweise mit (E)- oder (Z)-funktionalisierter Methylgruppe herstellen. Die Einführung der CD_3 -Gruppe im letzten Schritt ist jedoch unwirtschaftlich, da die Hälfte der teuren Markierung im Dimethylcuprat-Reagens verloren geht.



Schema 15.

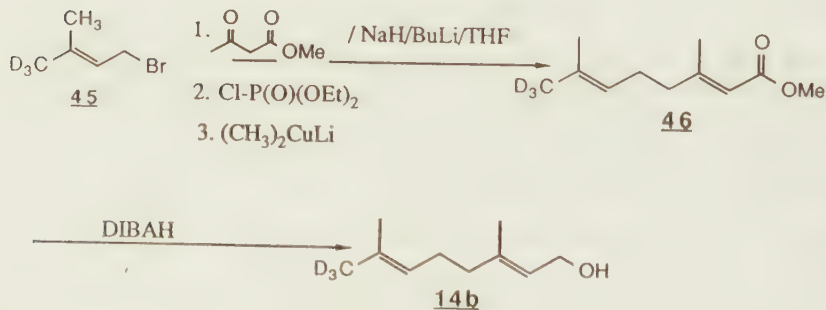
Die Herstellung von [8, 8, 8-²H₃]-Geraniol ausgehend von (E)-[4, 4, 4-²H₃]-1-Brom-3-methyl-2-buten wurde nach der Methode von Weiler et al. [60, 61] durchgeführt; s. Schema 16.

Nach dieser Methode wird das Dianion von Acetessigsäuremethylester mit dem Allylbromid **45** alkyliert und die Einführung einer Methylgruppe erfolgt durch Reaktion zwischen dem Enolphosphat und Li-Dimethylcuprat.

Die Doppelbindung C(2)-C(3) in **46** ist ausschliesslich (E)-konfiguriert (die β-Methylgruppe erscheint im ¹H-NMR Spektrum bei 2, 16 ppm).

Wir haben alle diese Reaktionen im Eintopf-Verfahren durchgeführt und das Produkt **46** mit einer Ausbeute von 73 % isoliert.

Der [8, 8, 8-²H₃]-Geraniensäuremethylester **46** wurde mit DIBAH in den entsprechenden Alkohol reduziert. Die spektroskopischen Daten von **14b** stimmten mit denjenigen von Hofer [39] überein.

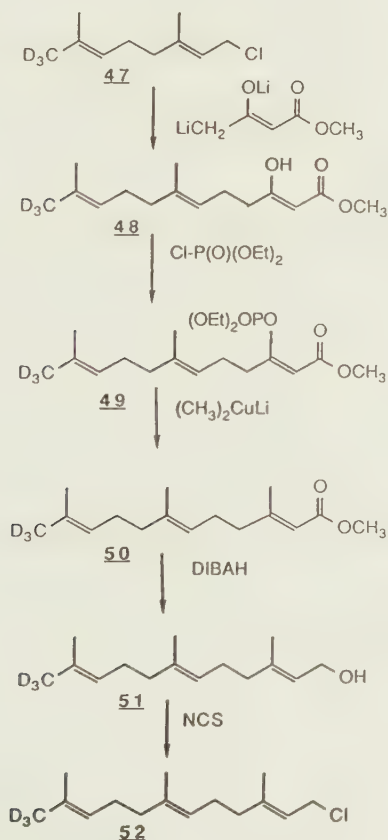


Schema 16

Für die weitere Verlängerung um eine Isopreneinheit wurde der Alkohol **14b** anschliessend mit $\text{CCl}_4/(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{P}$ ins Allylchlorid **47** umgewandelt; s. Schema 17. Im ^2H -NMR Spektrum von **47** erscheint ein Signal bei 1,666 ppm für die terminale (E)-ständige CD_3 -Gruppe.

Im Unterschied zur Herstellung von $[8, 8, 8\text{-}^2\text{H}_3]$ Geraniol **14b** musste das Enolphosphat **49** isoliert und anschliessend für die Alkylierungsreaktion mit Li-Dimethylcuprat eingesetzt werden (s. Schema 17).

Für die weitere Reaktion wurde der Ester **50** mit DIBAH zu **51** reduziert und anschliessend mit Hilfe von NCS/DMS ins entsprechende Allylchlorid **52** umgewandelt.



Schema 17

Eine direkte Funktionalisierung der endständigen Methylgruppen von Farnesol und Geranylgeraniol mit Selendioxid ergab - auch unter modifizierten Bedingungen [52] - zu schlechte Ausbeuten für unsere Zwecke. Wir bedienten uns zur Synthese dieser Verbindungen daher einer Reaktion von Trost et al. [62].

Sie beschrieben eine neue Methode zur C-C-Verknüpfung und wandten sie zur Synthese von Geranylgeraniol an. Das Prinzip besteht in der Aktivierung eines allylständigen Wasserstoffatoms durch die Bildung des π - Allyl- Komplexes mit PdCl_2 und anschliessender Substitution durch eine C - H - acide Verbindung (Estersulfon).

Als Edukt konnten wir die schon beschriebene Verbindung **44** (Abschnitt 6.3.1.2.) verwenden. Allylkomponte war (E, E)-Farnesylsäuremethylester; s. Schema 18.

Der π -Allylkomplex **55** liess sich aus Farnesylsäuremethylester, PdCl_2 und CuCl_2 darstellen. Unter diesen milden Bedingungen fand keine Isomerisierung der Doppelbindung an C(6) statt. Es wurde nur die terminale allylische C-H-Bindung zu einem Elektrophil aktiviert.

Die Alkylierung von **55** mit **54** in Anwesenheit von Triphenylphosphin in THF ergab als einziges Alkylierungsprodukt **56**. Die chemische Verschiebung der Methylgruppe im ^1H -NMR Spektrum weist die Regio- und Stereoselektivität dieser Reaktion nach (Singulett bei 1, 56 ppm).

Selektive Decarbomethoxylierung nach Trost et al. [62] geschah mit Lithiumiodid und Natriumcyanid und ergab das Produkt **57** mit einer Ausbeute von 44 %.

Kürzlich wurde eine verbesserte Methode zur Decarbomethoxylierung von Sulfonestern mit 4-Aminothiophenol und Cäsiumcarbonat als Katalysator veröffentlicht [63].

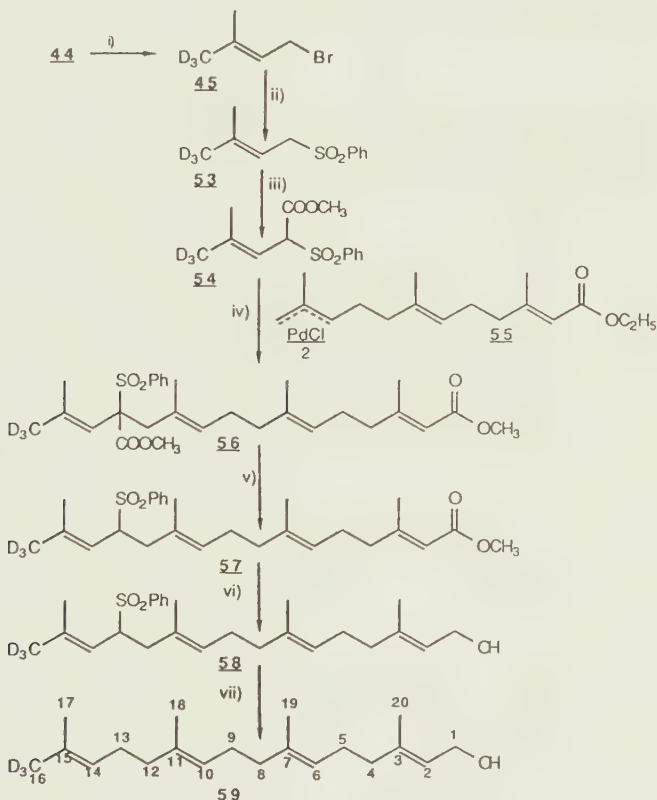
Damit konnte die Verbindung **57** mit einer Ausbeute von über 80% isoliert werden.

Nun erfolgte Reduktion des Esters **57** mit DIBAH zum Alkohol **58**. Die letzte Stufe, die Desulfonierung, wurde nach Trost et al. mit Li/EtNH_2 durchgeführt.

Die Autoren isolierten das gewünschte Produkt nach Kugelrohrdestillation mit einer Ausbeute von 98%. In unserer Nacharbeitung konnten wir trotz vieler Versuche diese Ausbeute nicht reproduzieren; wir erhielten [16, 16, 16 - $^2\text{H}_6$]-Geranylgeraniol nur in 50 % Ausbeute. Das ^1H -NMR Spektrum von **59** stimmt abgesehen vom Fehlen des CH_3 -Signals für C (16) mit den publizierten Daten überein.

In ^2H -NMR Spektrum erscheint das CD_3 -Signal bei 1,655 ppm.

Das CD_3 -Farnesol (**51**) wurde ebenfalls nach dieser Methode aus dem π -Komplex vom Geraniumsäuremethylester und der C_5 -Einheit **44** hergestellt.



Schema 18:

- i) PBr_3
- ii) NaSO_2Ph
- iii) $\text{BuLi}/\text{ClCOOCH}_3$
- iv) PPh_3/NaH in abs. THF
- v) p-Aminothiophenol/Cäsiumcarbonat
- vi) DIBALH
- vii) Li/EtNH_2

6.4. Prenylpyrophosphate

Polyphosphorsäureester sind energiereich und daher im allgemeinen instabil. Sowohl der Di- als auch der Triphosphorsäureester werden leicht unter Spaltung der anhydridischen Phosphor-Sauerstoff-Phosphor-Bindungen zu den Monophosphorsäureestern hydrolysiert. Daher erwies sich die Synthese solcher Pyrophosphate als schwierig.

6.4.1. Synthese

Für die Synthese der labilen Pyrophosphate bewährte sich in unseren Händen die Methode von Poulter und Mitarbeitern [64] eindeutig am besten, s. Schema 19 (andere Methoden siehe [65, 66]).

Phosphorylierungsreagenz war Tris(tetra-n-butylammonium)-hydrogenpyrophosphat. Zu seiner Herstellung wurde eine Lösung von Pyrophosphorsäure mit Tetrabutylammoniumhydroxid neutralisiert (pH 7), die ihrerseits auf einem Kationenaustauscher (H^+ -Form) aus Dinatriumdihydrogenpyrophosphat frisch zubereitet worden war.

Das sehr hygroskopische Reagens ist in DMSO und Acetonitril gut löslich und kann zur Reaktion mit wasserunlöslichen Alkylhalogeniden gebraucht werden.

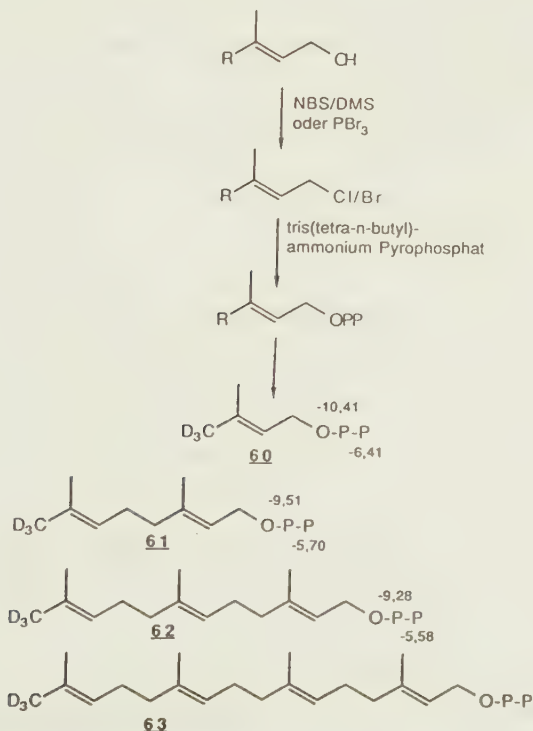
Vorteile der Reaktion sind:

1. Einsatz eines aktiven Phosphorylierungsreagenz.
2. Einfachere Reaktionsbedingungen, kürzere Reaktionszeit.
3. Grössere Ansätze möglich.
4. Effiziente Reinigungsprozedure.
5. Isolierung der Prenylpyrophosphate mit über 70 % Ausbeute (Ausnahme GGPP).

Die Prenylpyrophosphate (DMAPP, GPP, FPP) wurden durch Kationenaustausch, Verteilung zwischen 0, 1 M Ammonium-hydrogencarbonat und Isopropanol : Acetonitril (1:1) und schliesslich durch Chromatographie am Cellulose gereinigt.

Die Charakterisierung dieser Pyrophosphate wurde mit DC, ^1H -NMR und ^{32}P -NMR-Spektroskopie durchgeführt.

Das ^1H -NMR-Spektren zeigten für alle Pyrophosphate eine Hochfeldverschiebung um 0, 3 ppm des Protons an C(1) im gegensatz zum Allylalkohol. Das ^{32}P -NMR Spektrum ist sehr stark vom pH abhängig, und im Unterschied zur Literatur [64] haben wir für unsere Prenyl-pyrophosphate folgende Verschiebungen für P^α und P^β gefunden: s. Schema 19.



Schema 19

7. EIGENE ARBEITEN II : EINBAUVERSUCHE UND RESULTATE

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die in Teil I beschriebenen markierten und wasserlöslichen Vorläufer (**8e**, **60**, **61**, **62**, **63**) und das von Hofer [39] synthetisierte [$^2\text{H}_6$]-Lycopin mit einem geeigneten Organismus bzw. Enzymsystem in befriedigendem Mass zu cyclisieren. Die Analyse des daraus gebildeten Produktes sollte zur genauen Kenntnis der Stereochemie der einzelnen Ringschlussreaktionen in die β -, α - oder γ -Endgruppen führen.

7.1. Probleme der Analytik (Deuteriumnachweis)

Der Einsatz von stabilen Isotopen bei der Untersuchung von biosynthetischen Vorgängen verlangt einerseits eine genügende Incorporationsrate und andererseits eine hohe Reinheit des isolierten biosynthetisierten Produktes, um spektroskopische Untersuchungen durchführen zu können.

Dieser Abschnitt gibt eine Uebersicht über die verwendeten analytischen Methoden.

7.1.1. Massenspektrometrie

In Massenspektren (EI) deuterierter Verbindungen lassen sich mühelos deuterierte von protonenhaltigen Verbindungen unterscheiden. Die Zahl der eingebauten D-Atome lässt sich ebenso erkennen wie der Deuterierungsgrad von unvollständig markierten Verbindungen. Allerdings muss der Deuterierungsgrad deutlich höher liegen als der bei der gleichen Masse erwartete ^{13}C -Isotopenpik. Aus dem Fragmentierungsmuster lassen sich auch Aussagen über die Lage der D-Atome im Molekül gewinnen, jedoch im Allgemeinen keine Unterscheidung diastereotoper oder gar enantiotoper Stellungen ableiten.

Im Fall der Carotine kommt erschwerend die geringe Intensität des M^+ -Piks hinzu : bei nur geringer Deuterierung lässt sich M^+ der deuterierten Verbindung nicht mehr vom Rauschen unterscheiden.

7.1.2. Infrarotspektroskopie

Die Anwesenheit einer C - D - Streckschwingung bei ca. 2100 cm^{-1} im IR Spektrum weist das Vorkommen von C - gebundenem Deuterium im Molekül nach [67]. Durch die hohe Empfindlichkeit der Fourier-Transform IR-Spektroskopie lässt sich Deuterium auch bei einer relativ hohen Isotopenverdünnung noch nachweisen.

Die Nachweisgrenze wurde experimentell abgeklärt :

Von Märki [40] synthetisiertes $[16,16,16,16',16',16'-^2\text{H}_6]$ - β , β -Carotin wurde auf 1% bzw. 0, 1% mit unmarkierten β , β -Carotin verdünnt und davon die Spektren aufgenommen. Diese Spektren wurden von dem des reinen, unmarkierten β , β -Carotins subtrahiert und die C-D- Banden bei 2140 cm^{-1} in den Differenzspektren beobachtet. Danach liegt die Nachweisgrenze bei einer Isotopenverdünnung von 0, 5 - 1%; s. Fig. 4. Eine quantitative Bestimmung des Deuterierungsgrades kann aus der Intensität der C-D Banden ermittelt werden. Wiederum lässt sich mit dieser die Lage des Deuteriums im Molekül nicht bestimmen.

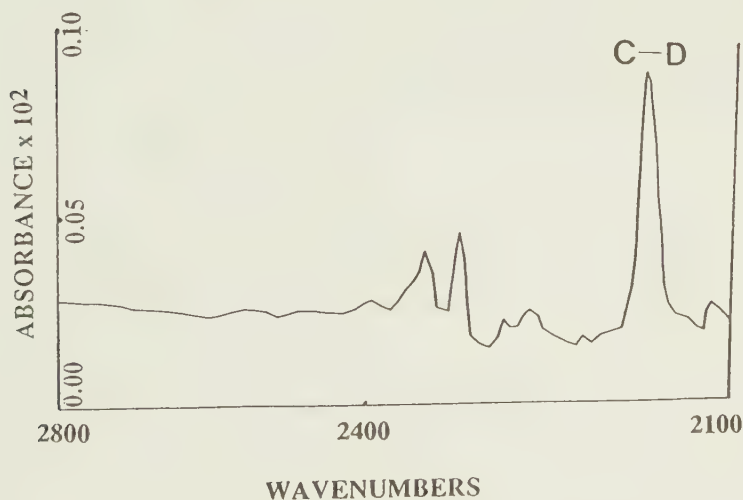


Fig 4: Differenzspektrum; $[16,16,16,16',16',16'-^2\text{H}_6]$ - β , β - Carotin (1%) - β , β -Carotin

7.1.3. Kernresonanzspektroskopie

Mit Hilfe von ^1H - und ^2H -Kernresonanzspektroskopie kann die Lage der Deuteriummarkierung im Molekül festgestellt werden. Eine exakte Integration bestimmter Absorptionsbereiche in ^1H -NMR-Spektren kann zur quantitativen Bestimmung des D - Gehalts angewendet werden. Durch ^2H -NMR-Spektren lässt sich diese Information bestätigen.

Die Identifizierung und Lokalisierung des Deuteriums im ^{13}C -NMR Spektrum kann aus der ^{13}C -D-Verschiebung und dem Kopplungsmuster ermittelt werden. Jedoch benötigt diese spektroskopische Methode eine ziemlich hohe Incorporationsrate und relativ grosse Probenmengen (mindestens einige Milligramme).

7.1.4. Circular dichroismus

Enantioselektiv deuterierte Verbindungen zeigen (meist schwache) CD - Effekte. Falls die Verbindung keine anderen Chiralitäten aufweist, die stärkere CD - Effekte bedingen, kann daher eine enantioselektive Deuterierung in CD-Spektren nachgewiesen werden. Allerdings muss auch hier der Deuterierungsgrad recht hoch sein.

7.2. *In vitro*- Experimente zur Biosynthese von Carotinoiden

Gegenwärtig werden zur *in vitro*-Untersuchung der Carotinoidbiogenese zellfreie Systeme aus verschiedenen Organismen verwendet. Zur Herstellung solcher Systeme hat Bramley in [68] alle Isolationstechniken zusammengefasst. Die Zellen werden mechanisch (Mixer, French Press), enzymatisch (Lysozym), durch osmotischen Schock oder durch Ultraschall aufgebrochen.

Dichtegradient-Zentrifugation erlaubt die Trennung in Fraktionen : cytosolische Membranen, intakte Organellen, Suborganell-Strukturen.

Dass die Carotinoid-Synthasen Membranproteine sind stellt ein zusätzliches Problem dar: sie müssen vor der Reinigung solubilisiert werden. Eine Reihe von Detergentien wurden bei der Herstellung von Enzymfraktionen aus *Phycomyces blakesleeanus* getestet [68]. Die Enzymaktivität zur Bildung von β , β -Carotin aus [^{14}C]-MVA war am höchsten in der Enzymfraktion, die mit Octylglucosid als Detergenz angesetzt war.

Kürzlich untersuchten Bramley und Sandmann [69] zwölf nicht ionische und acht ionische Detergentien bei der Isolierung vom Thylakoidpräparaten aus *Aphanocapsa* und testeten ihren Einfluss auf die *in vitro*-Umwandlung von [$3\text{-}^{14}\text{C}$]-GGPP in Phytoin, Lycopin und β , β -Carotin. Tween 40 erwies sich in *Aphanocapsa*-Thylakoiden als das geeignetste Detergenz.

In dieser Arbeit wird auch klargestellt, dass neben der Art des Detergenzes (ionisch,nichtionisch, Art der Reste) auch dessen Konzentration und die Behandlungsdauer optimiert werden müssen. Die optimalen Bedingungen schwanken von Spezies zu Spezies.

7.2.1. Experimente mit intakten Chloroplasten

7.2.1.1. Incorporationsversuche mit $[16,16,16,16',16',16'-^2\text{H}_6]$ -Lycopin

Wie in der Abschnitt 4.3. gezeigt wurde, sind in der Literatur einige Pflanzensysteme bekannt, welche die Incorporation radioaktiv markierten Lycopins in cyclische Carotine bewerkstelligen können.

In dieser Arbeit wurde auf das System von Porter [30], die Herstellung von Spinat-chloroplasten und von Acetonpulver aus Tomaten, verzichtet, da F. Isenring in unserer Gruppe mit diesen Systemen nicht ans Ziele gelangte.

Zuerst wandten wir das System von Hill et al. [34] für unsere Zwecke an. *Phaseolus vulgaris* (French bean) wurde im Gewächshaus gezogen. Zur Isolierung von intakten Chloroplasten wurden die in der Originalarbeit beschriebenen Methoden verwendet.

Die Incubation mit $[^2\text{H}_6]$ -Lycopin wurde in Phosphatpuffer (pH 7,5) in Gegenwart von Tween 80 als Detergenz, NADP und Magnesiumchlorid bei 25⁰ unter Beleuchtung durchgeführt. Eine kurze Ultraschallbehandlung zu Beginn der Incubationszeit sollte das $[^2\text{H}_6]$ -Lycopin bestmöglich solubilisieren.

Aus 100 Incubationsansätzen wurde nach Standardverfahren das β , β -Carotin isoliert. Für die CD-Untersuchung wurde das all-(E)-Isomer mittels HPLC gereinigt. Eine qualitative CD-Messung bei -180⁰ dieses all-(E)- β , β -Carotins zeigte keinen CD-Effekt. Massenspektren dieser Probe zeigten auch kein Signal für $[^2\text{H}_6]$ - β , β -Carotin. Weitere Incubationversuche mit Acetat- und TRIS-Puffern führten ebenfalls zu keinem Erfolg bei der Incorporation.

In unseren Händen liess sich unter den Bedingungen von Hill [34] kein oder nur ein ungenügender D- Einbau erzielen.

7.2.2. Experimente mit einem zellfreien System aus *Phycomyces blakesleeanus*

Phycomyceten gehören zu den niederen Pilzen. In der Literatur sind viele biosynthetische Untersuchungen über Carotine im Wildtyp *Phycomyces blakesleeanus* und in einigen Mutanten beschrieben [36].

Der C-115 Stamm von *Phycomyces blakesleeanus* (genotyp mad-107 (-)) ist ein durch Behandlung mit N-Methyl-N-nitroso-N'-nitroguandin erzeugter Mutant, welcher hauptsächlich β , β -Carotin accumuliert.

In Zusammenarbeit mit Dr. P. Bramley wurden die Incorporationsversuche mit [$^2\text{H}_6$] - Lycopin in einem Zellextrakt aus dem C-115-Mutanten an der Universität Konstanz durchgeführt. Die flüssigen Kulturen wurden nach [36] hergestellt und während 60h unter Beleuchtung bei RT geschüttelt. Die Isolierung des Myzels und die Herstellung des zellfreien Systems wurde wie in [36] durchgeführt. Dreistündige aerobe Incubation in Gegenwart von FAD, NADP, MgCl_2 , Tween 40 und [$^2\text{H}_6$]-Lycopin unter Beleuchtung ergab nach Aufarbeitung und gründlicher Reinigung im HPLC eine Probe β , β -Carotin, für die weder das CD-Spektrum (vgl. [40]) noch das Massenspektrum einen Einbau von Deuterium nachweisen konnten.

7.2.3. Experimente im *Flavobacterium R1560*

Flavobacterium R1560 ist ein gram-negatives Bacterium, welches von den Mikrobiologen bei F. Hoffman La Roche durch eine Mutation des Wildtyps gewonnen wurde. Das Hauptcarotinoid dieser Mutante ist das Zeaxanthin. Dr. G. Britton und Mitarbeiter in Liverpool haben mit diesem Organismus gründliche Studien zur Carotinoidbiosynthese durchgeführt [12]; s. Abschnitte 3.2.1. und 3.2.2.

7.2.3.1. Incubation mit $[^2\text{H}_3]\text{-C(3')-MVA}$

Da die Incorporationsversuche mit $[^2\text{H}_6]\text{-Lycopin}$ im Chloroplasten und *Phycomycetes* misslangen (die Lipophilie des Lycopins kann ein Grund gewesen sein) haben wir zuerst $[^2\text{H}_3]\text{-C(3')-MVA}$ (**8e**) als wasserlösliches Substrat verwendet. Wenn die $[^2\text{H}_3]\text{-C(3')-MVA}$ von Organismus ins Zeaxanthin eingebaut wird, wird ausser den Methylgruppen C-(18, 18'), C-(19, 19'), C-(20, 20'); und eine der beiden geminalen Methylgruppen durch CD_3 ersetzt sein.

Im Zeaxanthindiacetat lässt sich die ψ -axiale und ψ -equatoriale Methylgruppe an C(1) bzw. C(1') im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum identifizieren [71]. Die ψ -axiale Methylgruppe erscheint bei 1, 11 ppm und das Signal der ψ -equatorialen Methylgruppe bei 1, 08 ppm.

Diese Strategie ist komplementär zu Brittons Versuch [19] und kann mindestens dessen Resultat über den sterischen Verlauf des Ringschlusses in *Flavobacterium* verifizieren.

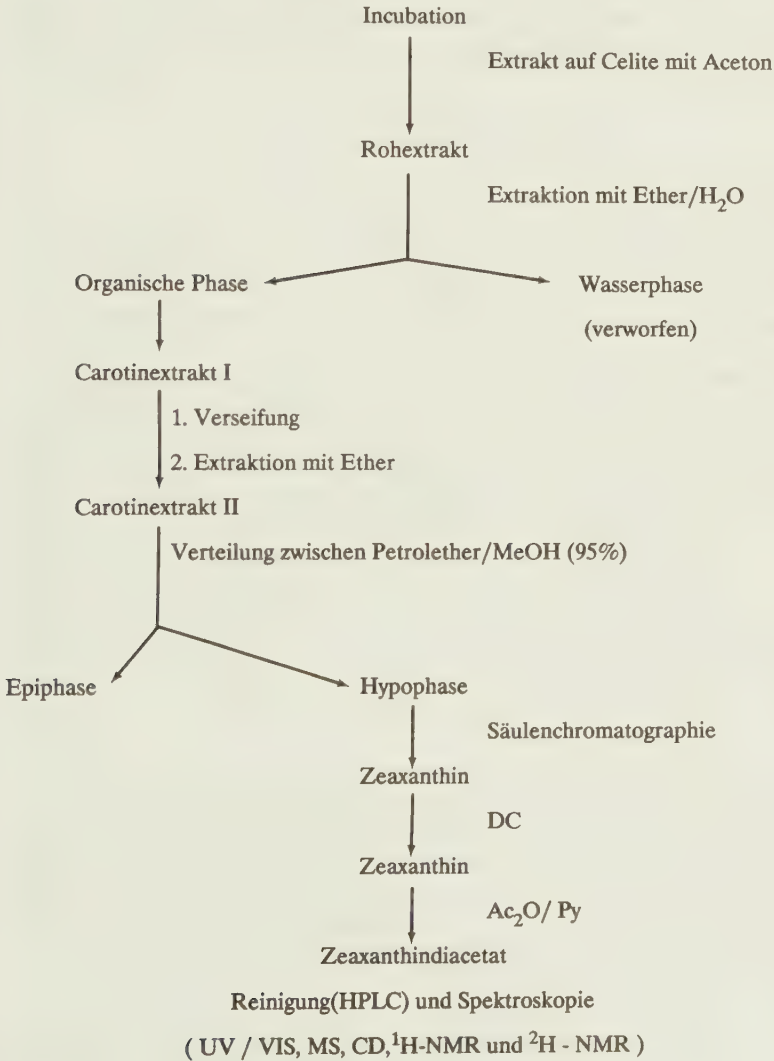
7.2.3.2. Kultur- und Incubationsbedingungen

Die Bakterien wurden mit Nährlösung [70] frisch überimpft und in einem Orbital-Incubator unter Beleuchtung und Rühren für 24h kultiviert. Ein Aliquot dieser Kultur wurde zum Einimpfen weiterer Kulturen gebraucht. Die Bakterien aus solchen Kulturen wurden durch Zentrifugation bei $10'000 \times g$ isoliert. Anschliessend wurden sie mit 0, 1 M TRIS.HCl Puffer (pH 7,0) gewaschen und wieder in 30 ml des gleichen Puffers aufgenommen.

Der Incubationsansatz enthielt ausser dem Substrat ($[^2\text{H}_3]\text{-C(3')-MVA}$) Lysozym und eine Lösung von $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und ATP. Die Incubation wurde 24 Std. bei RT unter kontinuierlichem Schütteln und unter Beleuchtung durchgeführt.

7.2.3.3. Isolation und Reinigung des Zeaxanthins

Nach Beendigung der Incubation wurde das gesamte Carotin isoliert und gereinigt; s. Schema 19.



7.2.3.4. Identifizierung des biosynthetisierten Zeaxanthins

Das gereinigte Zeaxanthin wurde durch Co-Chromatographie im HPLC und durch spektroskopische Methoden (UV/VIS, NMR, CD) identifiziert. Da sich die geminalen Methylgruppen im Zeaxanthin nicht differenzieren lassen, wurde es acetyliert. Durch FT-IR konnte zunächst nachgewiesen werden, dass die Verbindung tatsächlich Deuterium enthält.

7.2.3.4.1. Kernresonanz

Im ^1H -NMR Spektrum der deuterierten Verbindung müssen alle Signale markierter Methylgruppen je nach Einbaurate verminderte Intensität zeigen. Ein 100 proz. Abnahme der entsprechend deuterierten Signale ist hier nicht zu erwarten, da die biosynthetisierte deuterierte Verbindung mit der nicht markierten Verbindung (aus nicht markierten Vorläufern) verdünnt ist. Als interner Standard konnte das Integral über das scharfe Singulett der beiden Ac-Gruppen verwendet werden (2, 04 ppm). Vermindert sind die Integrale der Methylgruppen an C(20,20'), C(19,19'), C(18,18') sowie das Signal bei 1, 08 ppm, das der equatorialen Methylgruppe an C(1) entspricht. Nicht vermindert ist die Intensität des Singulets bei 1, 11 ppm, das Signal für die axiale Methylgruppe an C(1). Das Zeaxanthin wurde also an allen erwarteten Stellen markiert. Die Markierung erscheint an der ψ -equatorialen der geminalen Methylgruppen.

Im ^2H -NMR Spektrum werden für das Zeaxanthindiacetat nur Signale für vier Methylgruppen erwartet, nämlich das Signal für C(18,18'), C(19, 19'), C(20, 20') und für die equatoriale geminale Methylgruppe an C(1, 1'). Tatsächlich wurden drei Signale im Verhältnis 2:1:1 im ^2H -NMR Spektrum beobachtet; s. Fig. 5. Das Signal bei 1, 072 ppm weist die Markierung an der equatorialen geminalen Methylgruppe nach.

7.2.3.4.2. CD; s. Fig. 5

Die beobachtete CD-Kurve von Zeaxanthindiacetat (65) stimmt in ihrem gesamten Kurvenverlauf mit derjenigen von all-(3R, 3R')-Zeaxanthin überein.

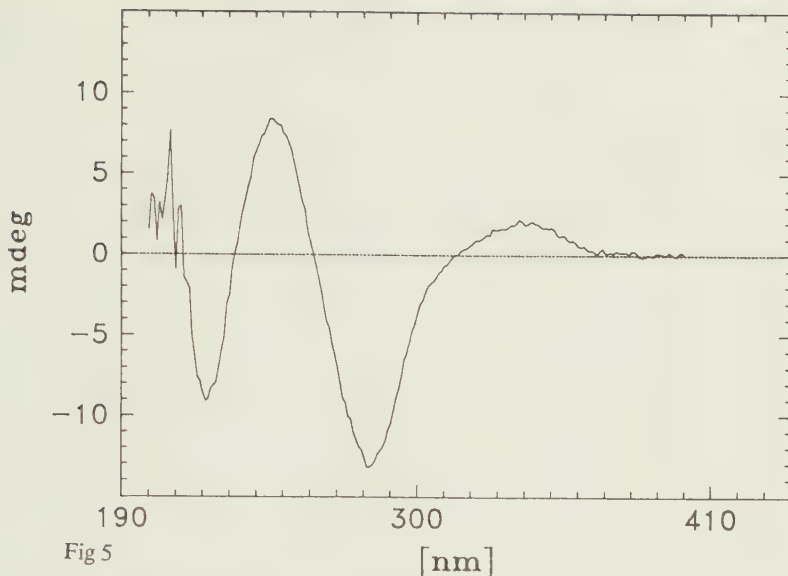


Fig 5

7.2.3.5. Interpretation dieses Resultats (s. Schema 20)

Wie man weiss, bleibt bei der Biosynthese der Terpene die Identität von C(2) der MVA in dem Sinne gewahrt, dass dieses die zur Estergruppe (E)-ständige Methylgruppe des Isopentylpyrophosphates bzw. die ebenfalls (E)-ständige Methylgruppe des Dimethylallyl-pyrophosphates liefert, s. Abschnitt 3.2.

Analog zu den Experimenten mit [2-¹³C]-MVA und Nicotin von Britton et al. [19] wurde hier die (Z)-terminale Methylgruppe des Lycopins mit [²H₃] markiert. Nach dem Cyclisationsschritt erscheint diese (Z)- terminale Methylgruppe in ψ -equatorialer Stellung.

Dieses Resultat ist komplementär zu demjenigen von Britton und bestätigt, dass der acyclische Vorläufer in *Flavobacterium* über die Konformationen S2 (5, 6(E)) oder W2 (5, 6(E)) oder S2 (5, 6(Z)) oder W2 (5, 6(Z)) cyclisiert wird. Da es sich um die Bildung eines β -Ringes handelt, kann über die Konfiguration der C(5)-C(6)-Doppelbindung nichts ausgesagt werden. Wenn man aber das Postulat berücksichtigt, dass ein Vorläufer mit (Z)-Konfiguration an C(5) in die ϵ -Reihe cyclisiert wird, bleiben als wahrscheinlichste Konformationen die ersten beiden erwähnten Faltungen.

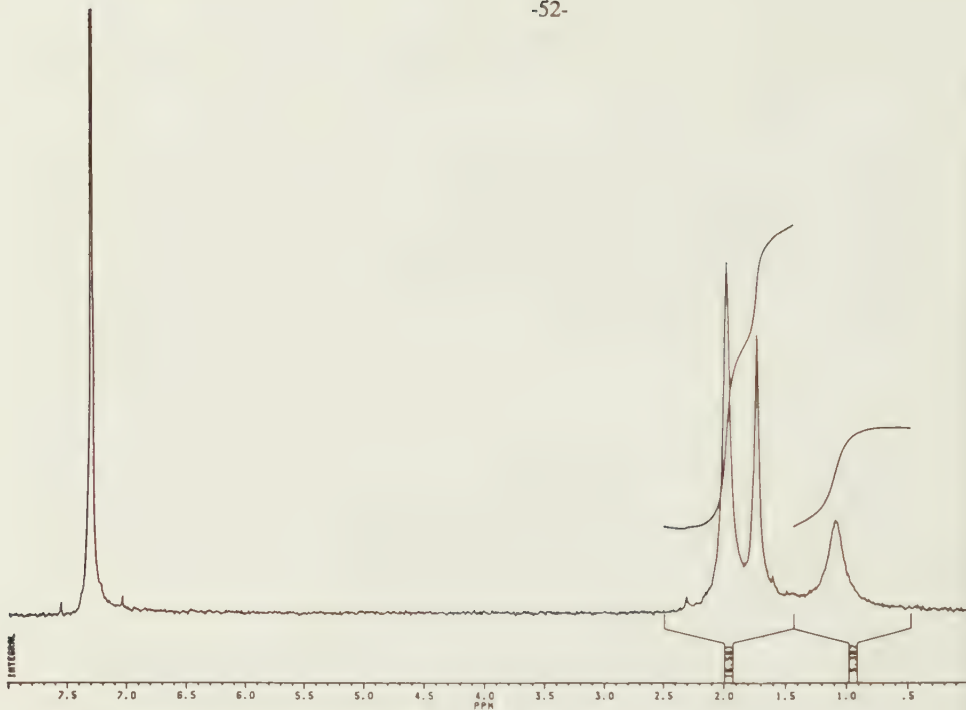
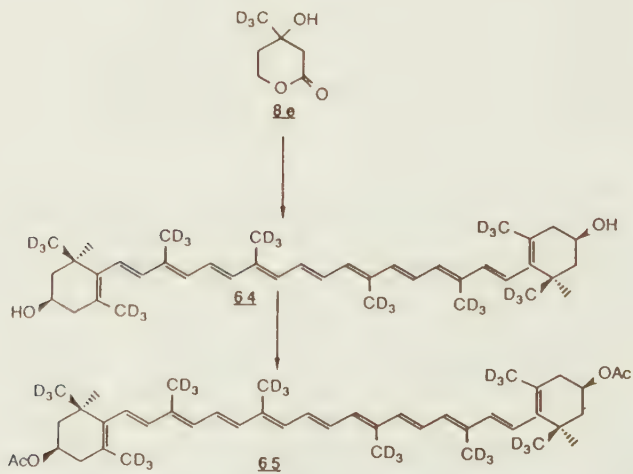


Fig 6: ^2H -NMR von Zeaxanthindiaceat



Schema 20: CD_3 -Markierung im biosynthetisierten Zeaxanthindiaceat

7.2.4. Incorporationsexperiment mit $[16,16,16,16',16'-^2\text{H}_6]$ - Lycopin

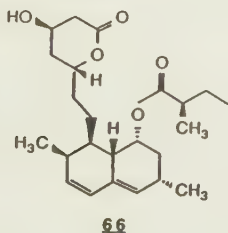
Durch die Incorporation von $[^2\text{H}_3]\text{-C}(3')\text{-MVA}$ in Zeaxanthin mit Hilfe von *Flavobacterium*-Zellen konnte das Resultat von Britton verifiziert werden; dieses Experiment hat aber folgenden Nachteil:

Hier wurde mit einem Substrat gearbeitet, welches nicht der direkte Vorläufer des cyclischen Carotins ist, und ausserdem konnte der Einbau nicht direkt im cyclischen Kohlenwasserstoff, sondern erst im hydroxylierten Carotin gezeigt werden.

Im *Flavobacterium R1560* kommt neben dem Hauptcarotinoid Zeaxanthin auch in kleinerer Menge das β , β -Carotin vor. Die Herstellung eines zellfreien Systems aus diesem Mikroorganismus kann auch die Zugänglichkeit der Enzymoberfläche für das acyclische Substrat erleichtern. So wurde in diesem Experiment versucht, das $[^2\text{H}_6]$ -Lycopin mit diesem System in β , β -Carotin einzubauen. Wenn dieser Einbau gelingt, kann die Stereochemie der Ringschlussreaktion bei der Bildung von β , β -Carotin nur aus der Interpretation des CD-Spektrums hervorgehen. Eine zu hohe Verdünnung des biosynthetisierten β , β -Carotins mit nicht markiertem endogenem Carotin erschwert die Aufnahme des CD-Spektrums. Eine Lösung dieses Problems kann durch den Einsatz geeigneter Inhibitoren, welche einen bestimmten Schritt der Terpenbiogenese vor der Lycopinbildung hemmen, erreicht werden.

Alberts et al. [74] isolierten aus *Aspergillus terreus* einen Metaboliten, Mevinolin (**66**), welcher sich als potenter Hemmer des Enzyms HMG-CoA-Reductase erwies.

Die Anwendung dieses Hemmers auf die Carotinoidbiosynthese kann die Konzentration des endogenen β , β -Carotins möglichst niedrig halten.



7.2.4.1. Herstellung des zellfreien Systems

Das *Flavobacterium R1560* wurde wie üblich kultiviert, jedoch enthielt das Kulturmedium zusätzlich Mevinolin. Die intakten Zellen wurden mit Hilfe einer French Press unter einem Druck von 10'000 psi dreimal aufgeschlossen. Nach jedem Durchgang wurde DNase zum Enzymextrakt gegeben. Das zellfreie System wurde mit Hilfe einer Zentrifugation bei 6'000 x g von den intakten Zellen getrennt. Der Ueberstand wurde als Enzymextrakt gebraucht.

7.2.4.2. Incorporationsbedingungen

Der Incorporationsansatz bestand aus 4 ml Enzymextrakt (300 mg Protein) Cofaktoren ($\text{MgCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) und $[\text{}^2\text{H}_6]$ -Lycopin (gelöst in Ethanol). Es wurden 300 solche Incubationsansätze bei 30⁰ für 3 Std. unter Beleuchtung angesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Methanol gestoppt.

7.2.4.3. Isolierung und Reinigung

Die Carotine wurden wie üblich extrahiert und verseift. Nach der Extraktion wurden sie zwischen Epi- und Hypophase verteilt. Die Carotine (Kohlenwasserstoffe) wurden zuerst an Alox (Aktivität III) mit 5% Ether in Hexan chromatographiert. Anschliessend wurde das β, β - Carotin durch Chromatographie auf einer Kieselgelplatte isoliert. Die Trennung des all (E)- β, β -Carotins von seinen (Z) - Isomeren geschah auf einer analytischen HPLC - Säule; s. Fig. 7. Das isolierte all-(E)- β, β -Carotin wurde schliesslich mit UV/VIS und ^1H -NMR Spektroskopie identifiziert.

7.2.4.4. NMR-Untersuchung des biosynthetisierten β , β -Carotins

Das ^1H -NMR Spektrum zeigte die Abwesenheit von (Z) - Isomeren (keine Tieffeld-Verschiebung um ca. 0,53 ppm für die Signale H-C(8) (im Fall 9Z) und H-C(12) (im Fall 13Z); vgl. [71]) was für CD-Untersuchungen wichtig ist. Im ^2H -NMR Spektrum lässt sich die Anwesenheit des Deuteriums im Molekül durch ein Signal bei 1,03 ppm bestätigen; s.Fig. 8.

Die beiden spektroskopischen Untersuchungen bestätigen nur die Konstitution des β , β -Carotins, geben jedoch keine Auskunft darüber, welche der beiden enantiotopen Methylgruppen am C(1) bzw. C(1') markiert ist.

7.2.4.5. CD-Untersuchung

Das Elektronenspektrum des biosynthetisierten β , β -Carotins stimmt mit demjenigen von all (E) β , β -Carotin überein.

Da das biosynthetisierte β , β -Carotin mit endogenem, nicht markiertem Material verdünnt ist, stellt sich ein zusätzliches Problem bei der Aufnahme der CD - Spektren , da das unmarkierte Carotin zwar die optische Dichte erhöht, aber keinen CD - Beitrag leistet. Wir konnten jedoch ein qualitatives, wenn auch recht stark verrauschtes Spektrum der Probe aufnehmen. Das Spektrum wurde wie die Referenzverbindung von Märki [40] bei -180° in EPA gemessen. Es zeigt einen Kurvenverlauf, der im Rahmen der Messgenauigkeit zu demjenigen von Märki (1R, 1R')-[$^2\text{H}_6$]- β , β -Carotin spiegelbildlich ist; s. Fig. 9.

Daraus kann geschlossen werden, dass das aus [$^2\text{H}_6$] - Lycopin biosynthetisierte β , β - Carotin die (1S, 1S')-Chiralität besitzt und daher über die Faltung S(2) oder W(2) des acyclischen Vorläufers gebildet worden sein muss.

Durch Vergleich der ΔE - Werte zwischen den beiden Spektren liess sich die Einbaurate (zwischen 5% und 10 %) abschätzen. *)

*) Diese Abschätzung wurde zusammen mit Dr. K. Noack (F. Hoffman La Roche) durchgeführt.

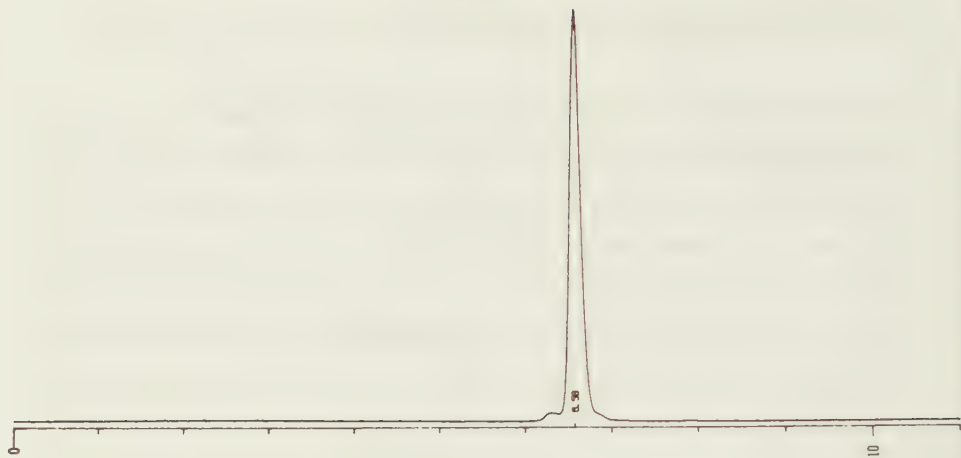


Fig 7: HPLC Chromatogram von biosynthetisierten $[^2\text{H}_6]$ - β,β -Carotin

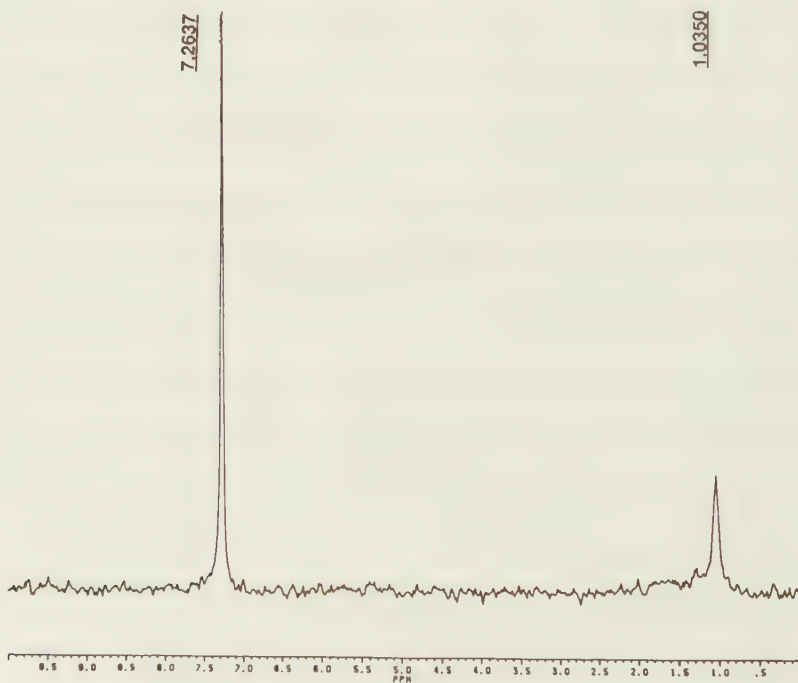


Fig 8: ^2H -NMR von biosynthetisierten $[^2\text{H}_6]$ - β,β -Carotin

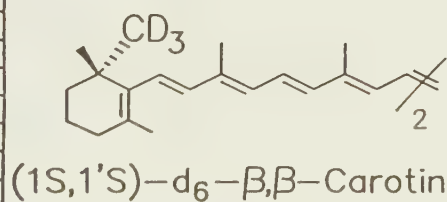
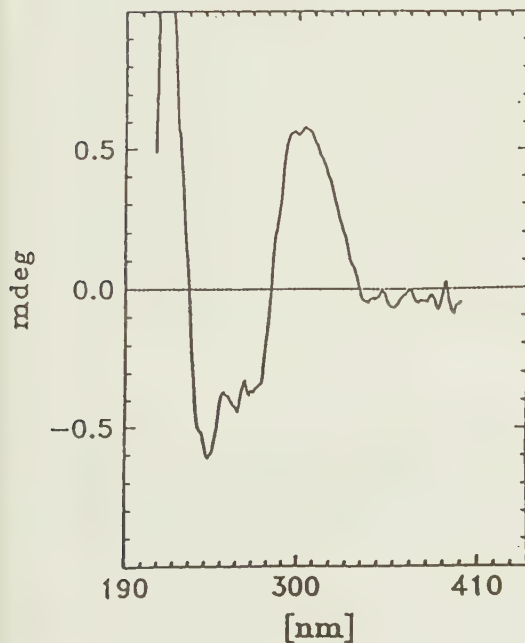
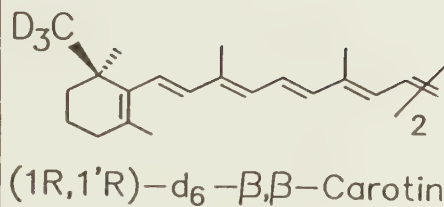
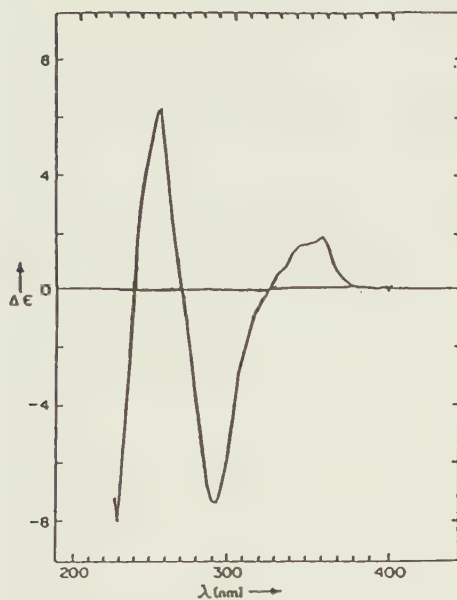


Fig 9: CD-Spektren von Synthetischem [40] und biosynthetisierten [²H₆]-β,β-Carotin

8. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die Resultate dieser Arbeit lassen sich folgendermassen zusammenfassen:

Es wurde zum ersten Mal die Synthese von spezifisch deuterierten Verbindungen beschrieben; s. Fig. 10.

Eine Reihe stereospezifisch deuterierter hydrophiler Terpenvorläufer (MVA, DMAPP, GPP, FPP und GGPP) wurden synthetisiert. Sie stehen für weitere Experimente zur Aufklärung der Stereochemie des Cyclisationsschrittes in der Biogenese von Terpenen zur Verfügung. Weitere Incorporationsexperimente beim höheren Pflanzen sind mit diesen markierten Pyrophosphaten im Gange.

Mit Hilfe von *Flavobacterium* konnte $[^2\text{H}_3]\text{-C}(3')\text{-MVA}$ in Zeaxanthin eingebaut und die Stereochemie des Produkts aufgeklärt werden.

Mittels eines zellfreien Systems aus dem gleichen Organismus gelang es sogar, das äusserst lipophile $[^2\text{H}_6]$ Lycopin in β , β - Carotin umzuwandeln und dessen Chiralität zu bestimmen. Dies ist meines Wissens das erste Experiment zur Carotincyclisierung mit Aufklärung der Stereochemie, bei dem zwischen dem eingesetzten Substrat und dem isolierten Produkt nur ein enzymatischer Schritt (die Cyclisierung) liegt. Die Resultate dieser Versuche bestätigen und ergänzen die Arbeiten von Britton und Mitarbeitern an gleichen Organismus. Damit ist es auch gelungen, von den von Hofer und Märki synthetisierten Substraten und Modellverbindungen den vorgesehenen Gebrauch zu machen.

Die Frage nach dem Verlauf der Carotincyclisierung ist von etlicher Bedeutung, da der Grossteil der natürlichen Carotine cyclische Endgruppen trägt. In höheren Pflanzen können nur cyclische Carotine ihre Schutz- und Hilfsfunktionen im Photosystem I und II erfüllen [76].

Die heute vorliegenden Daten zur enzymatischen Cyclisierung von Carotininen sind immer noch lückenhaft. Es fehlen Experimente in höheren Pflanzen. Das von Bu' Lock et al. in einem Pilz erhaltene Resultat steht im Gegensatz zu unseren Ergebnissen. Da neuerdings (S, S) - ϵ, ϵ -Carotin (das Enantiomer zur bisher beschriebenen ϵ -Endgruppe ist) aus zwei Quellen (Algen) isoliert worden ist [77, 78], dürfte es sich dabei nicht um einen Ausnahmefall handeln. Es scheinen in verschiedenen Organismen verschiedene Biogenesewege oder verschiedene stereochemische Abläufe zu existieren.

Im nächsten Schritt müsste nun die Untersuchung höherer Pflanzen in Angriff genommen werden. Dafür eignen sich wohl am besten Suspensionszell- Kulturen, zunächst mit hydrophilen Vorläufern. Ein weiteres noch zu lösendes Problem ist die Rolle der Konfiguration der 5, 6-Doppelbindung im offenkettigen Vorläufer (Bildung vom ϵ -Endgruppen aus 5(Z)-Vorläufern?). Einbauxperimente mit synthetischen deuterierten 5-(Z) -Vorläufern stellen erhebliche Probleme : Bereitstellung grösserer Mengen hoch isomeren reinen Substrats (> 99%, da sonst die Gefahr besteht, dass das Enzym selektiv mit einem nur als Verunreinigung anwesenden Stereoisomer reagiert), Ausschluss von Isomerisierungen während der Incubation.

Nur unter diesen Voraussetzungen lassen sich aus der Analyse der Produkte zuverlässige Schlüsse ziehen.

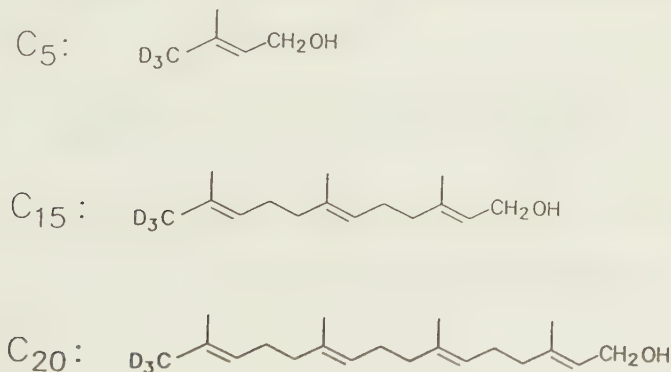


Fig 10

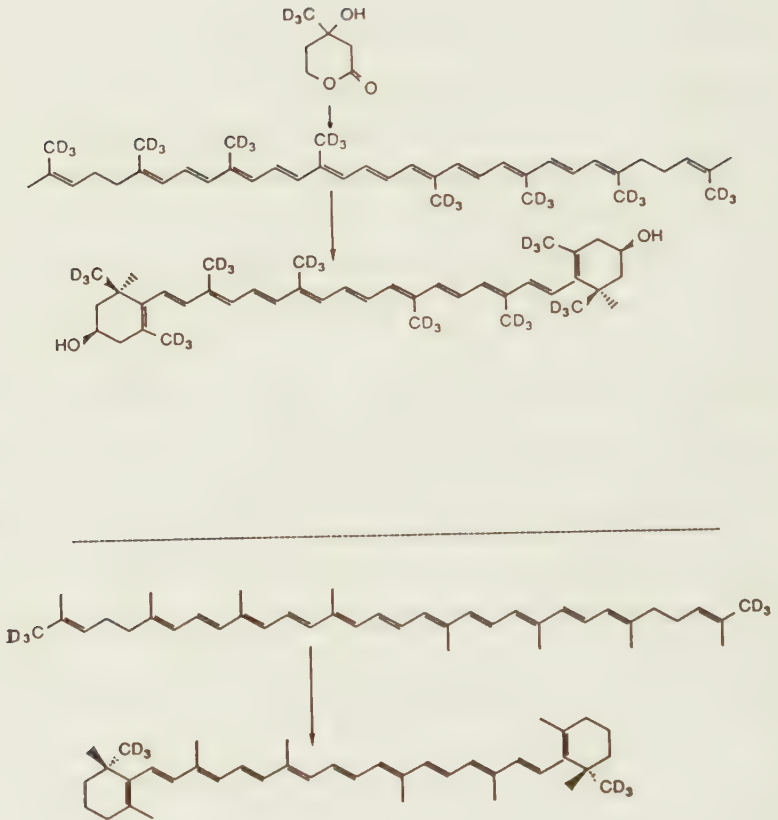


Fig 11: Zusammenfassung der Incorporationsversuche

9. VERDANKUNGEN

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich herzlich danken, insbesondere

Herrn Peter Uebelhart für die freundschaftliche Zusammenarbeit bei der schwierigen Herstellung von Prenylalkoholen und deren Pyrophosphate, welche er mit viel Geschick, Sorgfalt und Ausdauer durchgeführt hat.

Wichtig für das Zustandekommen dieser Arbeit war auch die freundschaftliche Unterstützung von Herrn Dr. Albrecht Zumbrunn, sei es mit erfrischenden Aufmunterungen oder durch seine Hilfe bei der Vorbereitung der Versuche und bei der Korrektur des Manuskriptes.

Herrn PD Dr. W-D. Woggon und Herrn Dr. H. P. Märki für die hilfsbereite, kompetente Beantwortung fachlicher Fragen und die moralische Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. W. v. Philipsborn und seinen Mitarbeitern für die Aufnahme der ^1H -, ^2H - und ^{32}P -NMR-Spektren.

Herrn Prof. Dr. M. Hesse und seine Mitarbeitern, nämlich Herrn N. Bild und Frau Dr. A. Lorenzi für die Aufnahme der Massenspektren.

Herrn H. Frohofer und seinen Mitarbeiterinnen für die Messung von IR-Spektren.

Herrn PD Dr. P. Rüedi und Frau Edith Märki-Fischer für bereitwillige Hilfe bei der HPLC.

Herrn Dr. R. K. Müller, Herrn Dr. E. K. Weibel und Dr. E. Hochuli von der HOFFMANN-LA ROCHE & CO. für die Ueberlassung von Geranylgeraniol und der *Flavobacterium* Spezies, Herrn Dr. G. Englert und Herrn Dr. K. Noack für die Aufnahme und und Interpretation von ^1H -NMR- & CD-Spektren,

Herrn Dr. M. Brown und den anderen Mitgliedern der Gruppe in Liverpool danke ich für die freundschaftliche Aufnahme und ihre Hilfe.

Herrn Dr. P. Bramley für die Mithilfe bei Incorporationversuchen bei *Phycomyces blakesleeana*.

Herrn Dr. A. W. Alberts von der Merck Sharp & Dohme für das grosszügige Geschenk von 500mg Mevinolin.

Herrn Dr. M. Rey für die Aufnahme der FT/IR Spektren.

Herrn R. Müller für die Einführung in den Textverarbeitung System.

Allen jetztigen und früheren Kolleginnen und Kollegen in unserer Carotingruppe für wertvolle Anregungen, nützliche Diskussionen, Kritik und für das gute Klima innerhalb der Gruppe, Frl. J. Farner, Frau E. Märki-Fischer, Frau Dr. H. Meier, Herren Dr. M. Acemoglu, B. Aeschlimann, A. Baummeler, Dr. R. Buchecker, D. Buschor, M. D'Agostinis, Dr. W. Eschenmoser, M. Gmünder, U. Grunder, Dr. A. Haag, Dr. H. P. Märki, U. Marti, A. Müller, R. Nick, Dr. H. Spreizer, P. Uebelhart und Dr. A. Zumbrunn.

Ganz besonders danke ich auch meine Schwägerin Brigitta Mahanty für ihre nie erlahmende tatkräftige Unterstützung.

10. EXPERIMENTELLER TEIL I: SYNTHESSEN

10.1. Allgemeines

Spektren wurden auf folgenden Geräten gemessen:

UV/VIS: PERKIN - ELMER 552

IR: PERKIN - ELMER - Spectrograph, Modell 257,
mit NaCl-Optik

FT/IR: Digilab FTS-15, mit einer Auflösung von
 $RES = 4 \text{ oder } 8 \text{ cm}^{-1}$ gemessen.

MS: CEC 21-110B und VARIAN MAT 711, bei 70 eV,
Direkteinlass (EI/CI)

$^1\text{H-NMR}$: 80 MHz: VARIAN FT-80

90 MHz: VARIAN EM-390

200 MHz: VARIAN XL-II 200

400 MHz: BRUKER WH-400

CD: JASCO J - 500 A mit Kryostat DN 704 (OXFORD
Instruments) und Temperaturkontrollgerät DTC - 2

10.1.1. Chromatographie

- GC: Carlo Erba Fractovap, Modell GI, Typ AID mit
Flammenionisationsdetektor und H_2 als Trägergas,
Glaskapillaren nach Grob [75],
26m X 0.31mm, SE 52, 2⁰/₀.
- HPLC: Säulen 250 X 4. 8mm, Detektionssystem HEWLETT
PACKARD 1040 A.
System A: Spherisorb S5 ODS, Acetonitril/THF 92 :8,
1 ml/min., Detektion bei 450 nm.
System B: Spherisorb S5 NH₂, Hexan/N-Ethyl-diisopropyl
amin 99, 9 : 0, 1, 0, 5 ml/min., Detektion bei 450 nm.
Alle Lösungsmittel wurden bei FLUKA und MERCK in
der HPLC Qualität bezogen, filtriert und eingesetzt.
- TLC: Kieselgel auf Alufolie, 60F 254, Schichtdicke 0, 2 mm
(MERCK). Aluminiumoxid auf Alufolie 60F 254,
neutral (Typ E) Schichtdicke 0, 2mm.
- Schichtchromatographie (präparativ): Fertigplatten MERCK,
Kieselgel: 60 F_{S254}, Schichtdicke 2mm.
- Säulenchromatographie: Aluminiumoxid: WOELM Pharma GmbH & Co.,
neutral, nach Vorschrift durch Wasserzusatz auf die
verschiedenen Aktivitätsstufen nach Brockmann
gebracht.
Kieselgel: MERCK Kieselgel 60, Korngrösse 0, 040 -
0, 063 mm.

10.1.2. Reinheit der verwendeten Chemikalien

Ausgangsmaterialien und Reagentien wurden bei FLUKA, ALDRICH und MERCK in den
Qualitäten puriss bzw. purum gekauft und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

10.1.3. Abkürzungen

Zusätzlich zu den bisher beschriebenen und den allgemein gebräuchlichen werden folgende Abkürzungen verwendet:

RT	Raumtemperatur
proz.	prozentig
ges.	gesättigt
THF	Tetrahydrofuran
LDA	Lithiumdiisopropylamid
HV	Hochvakuum
abs.	absolut
DMF	Dimethylformamid
DIBAH	Diisobutylaluminiumhydrid
NCS	N-Chlorsuccinimid
IPP	Isopentylpyrophosphat
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
GPP	Geranylpyrophosphat
FPP	Farnesylpyrophosphat
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
CPTA	2-(4-Chlorophenylthio)-triethylammoniumchlorid
EPA	Ether/Isopentan/Ethanol (5:5:2)
TRIS	2-Amino-2-(hydroxy)-1,3-propandiol

10.2. Synthese

10.2.1. [$^2\text{H}_3$]-C(3')-MVA

Die Synthese von **31** - **34** ist analog zu [46], jedoch gingen wir von Acetondicarbonsäuremethylester aus.

10.2.1.1. 1,3-Oxathiolan-2,2-diessigsäure-dimethylester (**31**)

Zu einer Lösung von 43,87 g (0,252 mol) Acetondicarbonsäuremethylester in 250 ml Methylenchlorid wurden unter Rühren zuerst 29,68 g (0,380 mol) 2-Mercaptoethanol und anschliessend 42,38 g (0,299 mol) BF_3 - Etherat zugegeben. Die Reaktionslösung wurde weiter 8 Std. bei RT gerührt. Nachher wurde die Reaktionslösung mit 400 ml Ether verdünnt und dazu vorsichtig 200 ml H_2O gegeben. Man rührte für 15 Min. weiter. Nach der Trennung der Wasserphase wurde die organische Phase mit Natriumhydrogencarbonatlösung und Sole gewaschen. Dann wurde die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und eingeengt. Dabei kristallisierte das Oel, Schmp. 45° . Nach der Trocknen am HV erhielt man 52,5 g (89 %) **31**.

$^1\text{H-NMR}$ (80MHz, CDCl_3): 3, 06 (t, $J=6$, 2H, 2H-C(4)); 3, 2 (AB, $J=18$, 4H); 3, 69 (s, 6H, OCH_3); 4, 19 (t, $J=6$, 2H, 2H-C(5)).

IR (CHCl_3): 2958 (w), 1740 (s), 1438 (s), 1342 (m), 1195 (w), 1175 (m), 1080 (m).

MS: 234 (6, M^+), 203 (3), 175 (11), 161 (33), 143 (16), 101 (25), 60 (100), 59 (35), 45 (14).

$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_5\text{S}$	Ber.	C	46,14	H	6,02	S	13,69
(234,273)	Gef.	C	46,21	H	5,90	S	13,69

10.2.1.2. 1,3-Oxathiolan-2,2-diethanol (32)

10 g (0,264 mmol) LiAlH_4 wurde in einem ausgeflamten 1 lt. Rundkolben unter N_2 vorgelegt und 120 ml abs. THF dazugegeben. Dann wurden 30,86 g (0,132 mmol) Diester **31** in 250 ml abs. THF unter Rühren zur Hydridlösung langsam zugetropft. Anschliessend wurde die Reaktionslösung über Nacht bei RT gerührt. Nach Beendigung der Reaktion erfolgte die Hydrolyse zuerst mit 15 ml H_2O , dann mit 15 ml 15 proz. NaOH und zum Schluss mit 45 ml H_2O . Es wurde weiter für 30 Min. gerührt und anschliessend das Produkt filtriert. Der Rückstand wurde mehrmals mit THF nachgewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Produkt **32** wurde nach der HV-Trocknung mit einer quantitativer Ausbeute als Oel erhalten. Dieses Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung für die nächste Stufe verwendet.

$^1\text{H-NMR}$ (80MHz, CDCl_3): 2, 17 (t, $J=6$, 4H, 2H-C(2',2'')); 3, 07 (s, 2H, H-O); 3, 08 (t, $J=6$, 2H, 2H-C(4)); 3, 81 (t, $J=6$, 4H, 2H-C(1',1'')); 4, 19 (t, $J=6$, 2H, 2H-C(5)).

MS: 196(100, $\text{M}^+ + 18(\text{NH}_3)$), 179 (24, $\text{M}^+ + 1$), 169(18), 136 (25), 120 (5), 102 (27), 85(6), 35 (12).

$\text{C}_7\text{H}_{12}\text{OS}$	Ber.	C	47,17	H	6,79	S	17,99
(178,25)	Gef.	C	47,28	H	7,01	S	17,76

10.2.1.3. 1-[(Tetrahydropyran-2-yl)oxy]-2-{2-[(tetrahydropyrany-2-yl)oxy]ethyl-1,3-oxathiolan-2-yl}ethan (33)

Zu einer Lösung von 23,52 g (0,132 mol) Diol 32 in 200 ml trockenem Methylenchlorid wurden bei 0° 33,73g (0,400 mol) frisch destilliertes 3, 4-Dihydro-2H-pyran, gefolgt von 0,5g (2,6 mmol) p-Toluolsulfonsäure unter Rühren zugegeben und bis zur Beendigung der Reaktion gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung mit 300 ml Ether verdünnt, mit Natriumhydrogencarbonat und Sole gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum eingedampft. Das Rohprodukt wurde an desaktiviertem Kieselgel mit Hexan / Ether 3 : 2 chromatographiert. Nach dem Trocknen am HV verblieben 42 g (92 %) 33 als Oel.

¹H-NMR (80MHz, CDCl₃): 1, 5 - 1, 8 (m, 12H, CH₂(Pyran)); 2, 2 (t, 4H, 2H-C(2', 2'')); 3, 05 (t, 2H, 2H-C(4)); 3, 4 - 4, 0 (m, 8H, 4H-C(1', 1''), CH₂(Pyran)); 4, 15 (t, 2H, 2H-C(5)); 4, 55 (m, 2H, H-C(Pyran)).

10.2.1.4. 1, 5 - Bis (tetrahydropyranyloxy)- 3- pentanon (34)

14 g (40 mmol) bis-Tetrahydropyranylether 33 wurden in 120 ml CH₃CN und 30 ml H₂O in einem Rundkolben vorgelegt. Unter Rühren wurde der Ansatz erst mit 8 g (80 mmol) CaCO₃ und dann mit 24 g (88 mmol) HgCl₂ versetzt und weiter bei RT während 2 Std. gerührt. Dann wurde die Reaktionslösung über Celite filtriert und der Rückstand mit Ether gut nachgewaschen. Es wurde kalte ges. NH₄OAc zum Filtrat gegeben und die organische Phase wurde noch einmal mit Ammoniumacetatlösung und anschliessend mit H₂O und Sole gewaschen. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat, Eindampfen des Ethers erhielt man 10, 41g (90%) 34.

¹H-NMR (80MHz, CDCl₃): 1, 48 - 1, 80 (m, 12H, CH₂(Pyran)); 2, 75 (t, 4H, 2H-C(2), 2H-C(4)); 3, 5 - 4, 15 (m, 8H, 2H-C(1), 2H-C(5), CH₂(Pyran)); 4, 55 (m, 2H, H-C(Pyran)).

IR (Film): 2940 (s), 1715 (s), 1350 (m), 1200 (m), 1120 (m), 1035 (m).

10.2.1.5. 1, 5-Bis(tetrahydropyranyloxy)-3-[²H₃]-methyl-3-pentanol (**35**)

1 g (41,14 mmol) Mg wurde in einem ausgeflamten Dreihalskolben unter N₂ und Feuchtigkeitausschluss in 60 ml abs. Ether vorgelegt. Dann wurde mit 0,5 ml CD₃I zuerst die Reaktion gestartet und der Rest des CD₃I (insgesamt 5 g) in 10 ml abs. Ether langsam zugetropft. Nach dem Abkühlen der Grignardlösung auf 0° wurde **34** (7,5g, 26,18 mmol) in 50 ml abs. Ether dazu gegeben und für 2,5 Std. unter Rückfluss gekocht. Der Hydrolyse erfolgte durch Zugabe von 75 ml ges. NH₄Cl-Lösung. Nach Phasentrennung wurde die wässrige Phase noch viermal ausgeethert, die vereinigten Etherphasen mit Sole gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und der Ether in Vakuum abgezogen. Reinigung der Rohprodukt am Kieselgel mit Hexan / Ether 9 : 1 ergab den Alkohol **35** als Oel.

¹H-NMR (80MHz, CDCl₃): 1,49 - 1,76 (m, 12H, CH₂(Pyran)); 1,85 (t, J=6, 4H, 2H-C(2 und 4)); 3,52 - 3,93 (m, 9H); 4,59 (br. s, 2H, H-C(Pyran)).

10.2.1.6. 3-([²H₃]-methyl)-1, 3, 5- Pentan-triol

1,44 g (4,72 mmol) Alkohol **35** wurden in 20 ml Methanol in einem Rundkolben vorgelegt und mit 0,23 g (1,2 mmol) p-Toluolsulfonsäure versetzt. Die Reaktionslösung wurde während 4 Std. unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen wurde die Reaktionslösung mit 30 ml CHCl₃ verdünnt und 0,201 g Natriumbicarbonat dazu gegeben. Es wurde weiter für 20 Min gerührt. Dann wurde das Reaktionsgemisch über Magnesiumsulfat filtriert und das Magnesiumsulfat mit CHCl₃ nachgewaschen. Das Lösungsmittel wurde i.V. abgezogen. Anschliessend wurde an Kieselgel mit CHCl₃ chromatographiert und am HV getrocknet. Die Ausbeute an **27b** betrug 0,55 g (85%).

¹H-NMR (90MHz, C₅D₅N): 2,10 (m, 4H, 2H-C(2), 2H-(4)); 4,15 (t, 4H, 2H-C(1), 2H-C(5)); 5,75 (s, 3H, H-O).

10.2.1.7. ($\pm$)-4-Hydroxy-4-([$^2\text{H}_3$]methyl)tetrahydropyran-2-on (**8e**)

Das zur Lactonisierung notwendige Ag_2CO_3 /Celite-Reagens wurde nach Fétizon et al.[44] frisch hergestellt. Zu 72 g (126 mmol) Ag_2CO_3 /Celite in 300 ml Benzol wurden 0,77g (5,6 mmol) Triol **27b** in 7 ml Methanol zugegeben. Anschliessend wurde das Methanol und das Restwasser des Fétizon-Reagens azeotrop mit Benzol von der Reaktionlösung abdestilliert. Man erhitzte 6 Std. am Rückfluss. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung abfiltriert und der Rückstand mit Toluol nachgewaschen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum eingengt. Nach Kugelrohrdestillation bei $110^0/10^{-2}$ Torr wurden 0,5 g klare Flüssigkeit erhalten.

^1H -NMR (80MHz, CDCl_3)^{*)}: 1, 83 - 1, 98 (m, 2H, 2H-C(4)); 2, 56 - 2, 62 (m, 2H, 2H(2)); 4, 25 - 4, 69 (m, 2H, 2H-C(5)).

IR (CHCl_3): 3603 (w), 3016 (s), 2227 (w), 1728 (s), 1404 (w), 1265 (m), 1234 (m), 1076 (m).

^{*)}Entgegen den IUPAC Regeln wird im folgenden die Numerierung in Formeln **8e** beibehalten.

10.2.2. Spezifisch markierte Isoprenoide

10.2.2.1. [4, 4, 4 - $^2\text{H}_3$]-2-Butin-1-ol (42)

12 g (522 mmol) Lithiumamid wurde in einem ausgeflamten Vierhalskolben unter Argon vorgelegt. Dann wurde bei -70° ca. 350 ml Ammoniak, welches über KOH getrocknet worden war, in den Kolben kondensiert. 10,2 ml (173 mmol) Propargylalkohol wurde unter N_2 innert 15 Min. zur Ammoniaklösung zugetropft. Nach 45 Min. wurden 25 g (173 mmol) deuteriertes Methyljodid innert 15 Min. zur Reaktionslösung getropft und 3 Std. weiter gerührt. Die Hydrolyse erfolgte mit 10 ml ges. NH_4Cl . Der Rückstand wurde in ca. 70 ml H_2O aufgenommen und im Perforator mit Ether über Nacht kontinuierlich extrahiert und die vereinigten Etherphasen über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingengt. Der Rückstand wurde über eine 10 cm Vigreuxkolonne fraktioniert destilliert, wobei der nichtreagierte Propargylalkohol bei $60 - 65^\circ/100$ mm Hg destillierte und das gewünschte Produkt, 42 bei $82^\circ/100$ mm Hg, Ausbeute 6,3 g (50 %).

^1H - NMR (90 MHz, CCl_4): 3, 6 (s, 1H, H-O); 4, 1 (s, 2H, 2H-C(2)).

10.2.2.2. 3-Iod-[4,4,4- $^2\text{H}_3$]- 2-buten-1-ol (43); [Analog 56]

4,85 g (127,5 mmol) Lithiumaluminiumhydrid wurde in 1lt abs. THF suspendiert und 14,2 g (255 mmol) ~ 97 proz. Natriummethoxid dazugegeben und die Mischung während 1/2 Std. unter Rückfluss gekocht. Dann wurde die Lösung auf RT abgekühlt und 4,66 g (63,8 mmol) 42, gelöst in 20 ml abs. THF, zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 3 Std. unter Rückfluss gekocht, dann auf -70° gekühlt und 62 g (244 mmol) Iod, gelöst in 140 ml abs. THF, während 20 Min. zur Reaktionlösung zugetropft und diese bei derselben Temperatur weiter für 1 1/2 Std. gerührt.

Nachher wurde das Kühlbad entfernt und sogleich die Reaktionslösung mit H_2O hydrolysiert und auf halbges. Sole gegossen. Das Rohprodukt wurde mit Ether extrahiert und anschliessend mit Natriumthiosulfatlösung und Sole gewaschen. Man trocknete über Magnesiumsulfat, filtrierte und engte ein. Säulenchromatographie an Kieselgel mit Methylenchlorid/Ether 9 : 1 ergab das Produkt **43**, Ausbeute 11,18 g (87%). Die Reinheit des Produkts genügte für die Fortsetzung der Synthese.

10.2.2.3. (E)-3-Methyl-[4,4,4- $^2\text{H}_3$]-2-buten-1-ol (**44**)

28 g (147,5 mmol) Kupferiodid wurde in 300 ml abs. Ether suspendiert und 185 ml (295 mmol) einer 1,6 M Methyllithiumlösung in Ether bei -15° während 1 Std. langsam zugetropft, wobei eine klare Lösung entstand. Dann gab man 11,9 g (59 mmol) Iodid **43** in ca. 30 ml abs. Ether dazu, verschloss unter Argon und liess während 4 1/2 Tagen bei 0° rühren. Man versetzte vorsichtig mit 4,5 ml Methanol und 10,5 ml Wasser, saugte über Celite ab und wusch mit Ether. Das Filtrat wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Säulenchromatographie an Kieselgel mit Methylenchlorid/Ether 4:1 und Kugelrohr destillation bei $100^\circ/100$ Torr ergab 3,72 g (71 %) **44**.

10.2.2.4. (E)-1-Brom-3-methyl-[4,4,4- $^2\text{H}_3$]-2-buten (**45**)

3g (33,66 mmol) **44** in 120 ml abs. Ether wurden unter Eiskühlung mit 1,7 ml (18 mmol) PBr_3 versetzt und 1 Std. bei RT gerührt. Nach Zugabe von verdünnter NaHCO_3 -Lösung wurde neutral gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt. Kugelrohrdestillation bei $100^\circ/160$ Torr ergab 3,4 g (66 %) **45**.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): 1,734 (s, 3H, 3H-C(3)); 4,019 (d, $J = 8, 5$, 2H, 2H-C(1)); 5,530 (t, $J = 7$, 1H, 1H-C(2)).

10.2.2.5. (2E, 6E)-3, 7- Dimethyl-[8,8,8-²H₃]-2,6-octadiensäure-methylester (46)

Zu einer Suspension von 459 mg (10,52 mmol) Natriumhydrid (55 % in Mineralöl) in 25 ml abs. THF wurden unter Eiskühlung 1,08 ml = 1,16 g (10 mmol) Acetessigsäuremethylester zugetropft. Nach 10 Min. wurde die klare Lösung mit 6,4 ml (10,24 mmol) einer 1,6 M Butyllithiumlösung in Hexan versetzt. Man liess weitere 10 Min. rühren und tropfte 1,6 g (10, 52 mmol) Allylbromid 45 zu, rührte nochmals 10 Min. bei RT und stellte den Ansatz wieder ins Eisbad. Dann versetzte man mit 1,52 ml = 1,82 g (10,52 mmol) Diethylchlorphosphat und rührte das Reaktionsgemisch während 2 Std. bei RT.

Lithiumdimethylcuprat wurde bei 0° durch langsames Zutropfen von 25 ml (40 mmol) Methylithiumlösung zu einer Suspension von 3,8 g (20 mmol) Kupfer(I)iodid in 25 ml abs. Ether hergestellt. Anschliessend wurde die Lösung auf - 78° gebracht und mit dem Reaktionsgemisch versetzt. Man liess das Reaktionsgemisch auf 0° erwärmen. Anschliessend wurde auf NH₄Cl-Lösung gegossen und dreimal mit Ether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden mit NH₃ in Sole und mit Sole gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingengt. Säulenchromatographie mit Hexan/Ether 7 : 3 an Kieselgel und anschliessende Kugelrohrdestillation bei 130°/10 Torr ergab 1,35 g (73 %) 46 als farbloses Oel.

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃): 1, 60 (s, 3H, CH₃-(7)); 2, 16 (s, breit, 7H, CH₃-(3) und 4H-C(4,5)); 3, 69 (s, 3H, OCH₃); 5, 07 (s, breit, 1H, H-C(2)); 5, 67 (s, 1H, H-C(6)).

IR (CHCl₃): 2956 (m), 2222 (w), 2186 (w), 1715 (s), 1650 (s), 1438 (s), 1150 (s).

10.2.2.6. (2E,6E)-3,7-Dimethyl-[8,8,8-²H₃]-2,6-octadien-1-ol (**14**)

1,134 g (7, 21 mmol) [²H₃]-Geraniumsäuremethylester **46** in 120 ml abs. THF wurde unter Eiskühlung mit 17 ml einer 1M DIBAH-Lösung in Hexan versetzt und während 10 Min. gerührt. Anschliessend wurde vorsichtig mit dem gleichen Volumen Wasser hydrolysiert und 1 Std. weiter gerührt. Nach der Zugabe von Ether wurden die Phasen getrennt. Die Wasserphase wurde zweimal mit Ether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden mit halbges. Sole gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingengt. Das Rohprodukt wurde im Kugelrohr destilliert, wobei das Produkt **14** bei 140⁰/10 Torr in quantitativer Ausbeute (1,145 g) erhalten wurde.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): 1, 60 und 1, 68 (2s, je 3H, CH₃-(7), CH₃-(3)); 2, 08 (s, gespalten, 5H, H-C(4, 5), 1H, H-O); 4, 15 (d, J = 7, 2H, 2H-C(1)); 5, 09 (s, breit, 1H, 1H-C(2)); 5, 42 (t, J = 7, 1H, 1H-C(6)).

IR (CHCl₃): 3610 (m), 2922 (s), 2222 (w), 2190 (w), 1668 (w), 1415 (w), 1380 (m), 980 (s).

MS: 126 (5, M⁺-CH₂OH), 93 (13); 72 (75); 40 (100).

10.2.2.7. (2E,6E)-1-Chloro-3,7-dimethyl-[8,8,8-²H₃]-2,6-octadien (**47**)

1,1 g (6,02 mmol), [²H₃]-Geraniol **14** und 2,42 g (9,23 mmol) Triphenylphosphin, welches vorher bei 50⁰/10⁻² Torr getrocknet worden war, wurden in 7 ml CCl₄ 2 Std. unter Rückfluss gekocht. Nach der Extraktion des Reaktionsgemischs wurde mit 15ml Ether verdünnt und unter Eiskühlung 10 Min. gerührt. Anschliessend wurde abfiltriert und eingengt. Das Rohprodukt wurde im Kugelrohr bei 60⁰/0,2 Torr destilliert. Ausbeute nach Destillation: 820 mg (78%).

¹H-NMR (90 MHz, CCl₄): 1, 60 und 1, 70 (2s, je 3H, CH₃-(7), CH₃-(3)); 2, 10 (s, 4H, H-C(4), H-C(5)); 4, 00 (d, J = 7, 2H, H-C(1)); 5, 05 (s, breit, 1H, H-C(2)); 5, 40 (t, 1H, H-C(6)).

²H-NMR (61, 4 MHz, CHCl₃): 1, 67 (s, 3D, D₃-C(8)).

10.2.2.8. (2E,6E,10E)-3, 7,11-Trimethyl-[12,12,12-²H₃]-2,6,10-dodecatriensäure-methylester (50)

Unter Eiskühlung wurde zu einer Suspension von 103 mg (2,367 mmol) NaH (55% in Mineralöl) in 5,5 ml abs. THF 250 mg (2,152 mmol) Acetessigsäuremethylester zugetropft und 10 Min. gerührt. Dann wurden 1,35 ml (2,152 mmol) einer 1,6 M Butyllithiumlösung in Hexan zur Reaktionslösung gegeben. Nach 10 Min. wurden 280 mg (1,593 mmol) [²H₃]-Geranylchlorid **47** mit der Reaktionslösung versetzt und 1 Std. bei 0⁰ und anschliessend 1 Std. bei RT gerührt. Die Hydrolyse erfolgte durch Zugabe von Wasser. Nach üblicher Aufarbeitung wurde das Rohprodukt an Kieselgel mit Hexan/Ether 4:1 gereinigt. Dabei konnte unreaktiertes Geranylchlorid zurückgewonnen werden (84 mg, 30%). Nach einer Kugelrohrdestillation bei 100⁰/10⁻² Torr wurde das Zwischenprodukt **48** in einer Ausbeute von 245 mg (64%) isoliert.

Unter Eiskühlung wurden zu einer Suspension von 48 mg (1,126 mmol) NaH (55% in Mineralöl) in 3,5 ml abs. THF 245 mg (1,023 mmol) Ketoester zugetropft. Man rührte das Reaktionsgemisch während 20 Min. bei 0⁰, versetzte es dann mit 194 mg (0,163 ml, 1,126 mmol) Diethylchlorphosphat und rührte das Gemisch noch 2 Std. bei RT.

Lithiumdimethylcuprat wurde wie für 10.2.2.5 beschrieben aus 430 mg (2,252 mmol) Kupfer(I)iodid und 2,82 ml (4,504 mmol) Methylolithiumlösung dargestellt. Bei -78⁰ versetzte man diese Lösung mit dem Reaktionsgemisch und liess auf 0⁰ erwärmen. Die Aufarbeitung wurde wie für 10.2.2.5. beschrieben durchgeführt.

Das Produkt **50** wurde nach Säulenchromatographie im Kugelrohr destilliert, Sdp. 100⁰/0,1 Torr und mit einer Ausbeute von 157 mg (61%) als farbloses Öl gewonnen.

¹H-NMR (90 MHz, CDCl₃): 1,60 (s, 6H, CH₃-(11), CH₃-(7)); 2,0 - 2,18 (m, 11H, CH₃-(3), 2H-C(4), 2H-C(5), 2H-C(8), 2H-C(9)); 3,68 (s, 3H, OCH₃); 5,10 (m, 2H, H-C(6), H-C(10)); 5,68 (s, breit, 1H, H-C(2)).

10.2.2.9. (2E, 6E, 10E)- 3,7,11-Trimethyl-[12,12,12-²H₃]-2,6,10-dodecatrien-1-ol (51)

CD₃- Farnesol 51 wurde aus 157 mg (0, 620 mmol) 50 durch DIBAH wie unter 10.2.2.6. , beschrieben dargestellt. Rohausbeute 147 mg.

10.2.2.10. [²H₃]-Farnesylchlorid (52)

98 mg (0,74 mmol) NCS in 3ml abs. Methylenchlorid wurden bei -30⁰ mit 0,54 ml (0,74 mmol) Dimethylsulfid versetzt. Man liess 45 Min. rühren und die Temperatur dabei auf 0⁰ ansteigen. Dann kühlte man auf -40⁰ und tropfte den in 1ml Methylenchlorid gelösten Alkohol 51 (140 mg, 0, 62 mmol) zu. Man liess während 1 Std. langsam auf 0⁰ erwärmen und eine weitere Stunde bei dieser Temperatur rühren. Das Reaktionsgemisch wurde anschliessend mit Ether verdünnt und auf Sole gegossen. Extraktion mit Ether, Trocknung über Magnesiumsulfat, Filtration und Einengen ergab das Rohprodukt 52. Das Chlorid wurde ohne weitere Reinigung für die Darstellung von Farnesylpyrophosphat 62 eingesetzt.

Herstellung von [²H₃]-Geranylgeraniol (59)

Die Synthese von 59 wurde analog [62] durchgeführt.

10.2.2.11. (E)-3-Methyl-1-(phenylsulfonyl)-[4, 4, 4-²H₃]-butan (53)

1, 24 g (13, 9 mmol) 44 wurden in 60 ml abs. Ether gelöst und auf 0⁰ gekühlt., 0, 56 ml (1, 6 g, 5, 9 mmol) Phosphortribromid in 30 ml abs. Ether gelöst und langsam zutropft. Anschliessend wurde 2 Std. bei RT gerührt. Durch vorsichtige Zugabe von ges. Natriumhydrogencarbonatlösung wurde neutralisiert. Die Etherphase wurde abgetrennt, die Wasserphase viermal mit Ether extrahiert und die vereinigten Etherphasen über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und bei 30⁰/300 Torr eingengt. Das rohe Bromid 45 wurde für die anschliessende Reaktion nicht weiter gereinigt und sofort angesetzt.

Das rohe Bromid wurde in 12 ml DMF aufgenommen, 2,3 g (14 mmol) Na-Benzolsulfonat zugegeben und das Gemisch 20 Std. bei RT gerührt. Anschliessend wurde die Reaktionslösung auf halbges. Sole gegossen und danach mit Ether extrahiert. Kristallisation des Rückstandes aus Ether/Hexan ergab 800 mg **53** in farblosen Kristallen. Chromatographie der Mutterlauge an Kieselgel mit Methylchlorid/ Ether 9 : 1 ergab weitere 152 mg des Produkts. Die gesamte Ausbeute betrug 32 %.

¹H-NMR (CDCl₃, 200MHz): 1, 31 (s, 3H, CH₃-C(3)); 3, 79 (d, J=8, 2H, H-C(1)); 5, 19 (t, J=8, 1H, H-C(2)); 7, 55 bis 7, 61 (m, 3H); 7, 86 bis 7, 89 (m, 2H).

10.2.2.12. 4-Methyl-2-(phenylsulfonyl)-[5,5,5-²H₃]-3-pentensäure-methylester (**54**)

866 mg (4,06 mmol) **53** wurde in 40 ml THF gelöst und bei -20⁰ mit 3,6 ml 1,6 M Butyllithiumlösung in Hexan tropfenweise versetzt. Es wurde bei dieser Temperatur weiter für 10 Min. gerührt. Anschliessend wurde 1 ml (1,23g, 12,9 mmol) Chlorameisensäure-methylester zugegeben und die Reaktionslösung langsam auf 10⁰ kommen lassen. Es wurde weiter während 2 Std. bei RT gerührt.

Man goss auf halbges. Sole. Die Etherphase wurde abgetrennt, die Wasserphase dreimal mit Ether extrahiert und die vereinigten Etherphase über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt. Säulenchromatographie an Kieselgel mit Ether/Hexan 7 : 3 ergab 760mg (69%) des Produkts **54**.

¹H-NMR (90 MHz, CDCl₃): 1, 46 (s, 3H, CH₃-C(3)); 3, 70 (s, 3H, OCH₃); 4, 75 (d, J=9, 1H, H-C(1)), 5, 28(d, J=9, 1H, H-C(2)).

10.2.2.13. (2E,6E,10E,14E)-13-(Methoxycarbonyl)-3,7,11,15-tetramethyl-13-(phenylsulfonyl)-[16,16,16-²H₃]-2,6,10,14-hexadecatetraensäure-methylester (56**)**

814 mg (3,0 mmol) π -Allyl-Komplex [62] **55** wurden in 90 ml abs. Ether vorgelegt und mit 394 mg (1,5 mmol) Triphenylphosphin versetzt. Man rührte 10 Min. weiter und anschliessend wurde der Ether auf dem Wasserbad durch Einblasen von N₂ entfernt. Der Rückstand wurde 2 Std. am HV getrocknet anschliessend mit 45 ml abs. THF aufgenommen und erneut mit 394 mg (1,5 mmol) Triphenylphosphin versetzt (Lösung I).

Zu einer Suspension von 136 mg Natriumhydrid (55% in Mineralöl) in 40 ml abs. THF wurden 814 mg (3,0 mmol) **54** gelöst in 8 ml abs. THF bei RT zugetropft und weiter wurde bis zur Bildung einer klaren Lösung (ca. 30 Min.) gerührt. Diese Lösung wurde nun auf einmal zur Lösung I zugegeben und das Ganze während 5 Std. bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde auf halbges. Sole gegossen, mit Ether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet. Filtrieren, Einengen und anschliessende Chromatographie an Kieselgel mit Hexan/Essigester 3 : 2 ergab 547 mg (34%) **56** als farbloses Oel.

¹H-NMR (90 MHz, CDCl₃): 1, 25 (t, J=7,5, 3H, Ester-CH₃); 1, 40 (s, 3H, CH₃-C(15)); 1, 56 (s, 6H, CH₃-C(7), CH₃-C(11)); 1, 93 (br. s, 4H(CH₂)); 2, 13 (s, 7H, CH₃-C(3), 4H(CH₂)); 2, 95 bis 3, 05 (je br. s, 2H, H-C(12)); 3, 66 (s, 3H, OCH₃); 4, 13 (q, J=7,5, 2H, CH₂-O); 5, 10 (m, 2H, H-C(6), H-C(10)); 5, 30 (s, 1H, H-C(14)); 5, 63 (s, 1H, H-C(2)); 7, 36 bis 7, 63 (m, 3H); 7, 76 bis 8, 0 (m, 2H).

10.2.2.14. (2E,6E,10E,14E)-3,7,11,15-Tetramethyl-13-(phenylsulfonyl)-[16,16,16-²H₃]-2,6,10,14-hexadecatetraensäure-methylester (57)

547 mg (1,025 mmol) 56, 270 mg (2,15 mmol) p-Aminothiophenol und 120 mg (0,368 mmol) Cäsiumcarbonat wurden in 6ml abs. DMF gelöst und bei 85⁰ während 1,5 Std. gerührt.

Das Gemisch wurde auf RT gekühlt und auf halbges. Sole gegossen. Diese wurde 3mal mit Ether extrahiert. Die Etherphasen wurden mit 1N HCl und anschliessend mit Sole gewaschen. Man trocknete über Magnesiumsulfat, filtrierte und engte ein. Chromatographie an Kieselgelplatten mit Hexan/Essigester 3:1 ergab 314 mg (64%) 57.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): 1, 14 (s, 3H, CH₃-C(15)); 1,28 (t, J=7,5, 3H, Ester-CH₃); 1, 51 (s, 3H), 1,57 (s, 3H), 1, 88 bis 2, 12 (m, 8H, H-C(4,5,8,9)); 2, 15 (s, 3H, CH₃-C(3)); 2, 85 (d, J=15, 2H, H-C(12)); 3, 84 (m, 1H, H-C(13)); 4, 14 (q, J=7,5, 2H, CH₂-O); 4, 89 (d, J=10, 1H, H-C(14)); 5, 60 (m, 2H, H-C(6,10)); 5, 66 (s, 1H, H-C(2)); 7, 4 bis 7,7 (m, 3H); 7, 8 bis 7, 9 (m, 2H).

IR (CHCl₃): 2935 (br. m), 2984 (m), 1708 (s), 1648 (m), 1450 (m), 1385 (w), 1305 (s), 1145 (s), 1085 (m).

10.2.2.15. (2E,6E,10E,14E)-3,7,11,15-Tetramethyl-13-(phenylsulfonyl)-[16,16,²H₃]-2,6,10,14-hexadecatetraen-1-ol (58)

600 mg (1,26 mmol) 57 wurden in 40 ml abs. THF gelöst und darauf bei -20⁰ mit 3 ml einer 1m Lösung von DIBAH in Hexan tropfenweise versetzt. Nach 1 Std. Rühren bei -20⁰ und später bei -10⁰ wurde die Reaktionslösung mit Wasser hydrolysiert und mit Ether verdünnt. Die Etherphase wurde abgetrennt, die Wasserphase mit Ether extrahiert und die vereinigten Etherphasen mit Sole gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Nach Einengen wurde an Kieselgelplatten mit Ether/Hexan 7 : 3 chromatographiert. Man erhiehl 58 in einer Ausbeute von 495 mg (91%).

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): 1,13 (s, 3H, CH₃-C(15)); 1,43 (s, 1H, O-H); 1,51 und 1,68 (2s, CH₃-C(7,11)); 1,57 (s, 3H, CH₃(16)); 1,89 bis 2,139 (m, 8H, H-C(4,5,8,9)); 3,86 (m, 1H, H-C(13)); 4,16 (d, J=7, 2H, H-C(1)); 4,89 (d, J=11, 1H, H-C(14)); 5,00 - 5,20 (m, 2H, H-C(12)); 5,41 (t, J=7, 1H, H-C(2)); 7,47 bis 7,62 (m, 3H); 7,81 bis 7,86 (m, 1H).

10.2.2.16. (2E,6E,10E,14E)-3,7,11,15-Tetramethyl-[16,16,16-²H₃]-2,6,10,14-hexatetraen-1-ol 59, analog [62]

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): 1, 60 (s, 9H, CH₃-C(7,11,15)); 1, 68 (s, 3H, CH₃-C(3)); 4, 15 (d, J=6, 8, 2H, H-C(1)); 5, 11(br. s, 3H, H-C(6,10,14)); 5,42 (m, 1H, H-C(2)).

²H-NMR (61,4 MHz, CHCl₃): 1,65 (s,3D, D₃-C(16)).

MS: 293 (M⁺;9); 277 (M⁺-H₂O,27), 276 (100), 220 (23), 208 (84), 194 (30), 189 (19),180 (29), 166 (35), 152 (59), 149 (58), 140 (69), 135 (42), 126 (41),123 (53), 121 (62), 109 (40), 95 (43), 81 (70), 72 (45).

10.2.3. Prenylpyrophosphate

Die Prenylpyrophosphate 60, 61, 62 sind analog wie in [64] beschrieben dargestellt worden.

10.2.3.1. (E)-3-Methyl-[4,4,4-²H₃]-2-butenyl-pyrophosphat (60)

¹H-NMR (200 MHz, D₂O/ND₄OD): 1, 73 (s, 3H, CH₃-C(3)); 4, 46 (br. s, 2H, H-C(1)); 5, 46 (br. s, 1H, H-C(2)).

³¹P-NMR (81 MHz, D₂O/ND₄OD): - 10, 47 (br. s, P(1)); - 6, 41 (br. s, P(2)).

10.2.3.2. (2E,6E)-3,7-Dimethyl-[8,8,8-²H₃]-2,6-octadienyl-pyrophosphat (61)

¹H-NMR (200 MHz, D₂O/ND₄OD): 1, 64 (s, 3H, CH₃-C(7)); 1, 73 (s, 3H, CH₃-C(3)); 2, 14 (m, 4H, H-C(4,5)); 4, 48 (dd, je J=6,6, 2H, H-C(1)); 5, 24 (m, 1H, H-C(6)); 5, 48 (br. t, J=7, 1H, H-C(2)).

³¹P-NMR (81 MHz, D₂O/ND₄OD): - 9,51 (d, J=21, P(1)); 5, 70 (d, J=22, P(2)).

10.2.3.3. (2E,6E,10E)-3,7,11-Trimethyl-[12,12,12-²H₃]-2,6,10-dodecatrienyl-pyrophosphat (62)

¹H-NMR (400MHz, D₂O): 1, 62 (s, 6H, CH₃-C(7,11)); 1, 72 (s, 3H, CH₃-C(3)); 2, 04 bis 2, 17 (m, 8H, H-C(4,5,8,9)); 4, 48 (m, 2H, H-C(1)); 5, 20 (m, 2H, H-C(6,10)); 5, 50 (m, 1H, H-C(2)).

³¹P-NMR (81 MHz, D₂O/ND₄OD): -9, 28 (br. s, P(1)); -5, 58 (br. s, P(2)).

11. EXPERIMENTELLER TEIL II

11.1. Allgemeines

Sämtliche Chemikalien, welche für die Nährlösungen und Incubations-Ansätze verwendet wurden, sind von der Firmen MERCK, DIFCO und Sigma in puriss. Qualität bezogen worden. Ein Autoklav der Firma FEDEGARI, Serie FVS₃ diente zur Sterilisation der Nährlösungen. Animpfen des Schrägagars und von flüssigen Kulturmedien wurde in einer Sterilbox durchgeführt.

11.2. Mikrobiologische Arbeiten

11.2.1. Nährlösung und Kulturbedingungen

Für die Aufbewahrung der *Flavobacterium R1560* Kulturen bei 26⁰ diente das folgende Agar Milieu:

Glucose	5 g
Hefe-Eextrakt	10 g
Tryptone	10 g
NaCl	30 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5 g
Agar	3%(w/v)

Das Gemisch wird in 1l dest. H₂O gelöst und mit 0,1M NaOH auf pH 7, 2 eingestellt. Nach dem Abfüllen in Reagenzgläser bzw. Petrischalen wurde 15 Min. bei 120⁰ sterilisiert.

Nach dem Sterilisieren liess man die Reagenzgläser in der Sterilbox in Schräglage abkühlen. Diese Schräg-Agar liessen sich im Kühlschrank gut einige Woche (max. 4) aufbewahren.

Das Animpfen der Schrägagar erfolgte mittels einer Platinöse. Mit der im

Bunsenbrenner ausgeglühte Öse berührte man leicht eine Bakterienkolonie und übertrug das Impfmateriel durch eine sanfte Zickzack-Streichbewegung auf den neuen Schrägagar. Anschliessend liess man die Kulturen in einem Incubationsraum bei 26° unter Beleuchtung bebrüten, wobei innert 4-5 Tagen allmählich die charakteristische intensiv gelbe Farbe des Hauptcarotinoids, Zeaxanthin, sichtbar wurde. Diese gewachsenen Bakterienkulturen dienten zum Animpfen der Flüssig-Kulturmedien. Die Schrägagar-Kulturen wurden alle 7 Tage erneuert.

Die Flüssig-Kulturmedien enthielten alle die gleichen Reagenzien wie die Schrägagar Kulturen, jedoch fehlte der Agar. Das Wachstum der Bakterien im Flüssigemedium erfolgte in einem modifizierten 250 ml bzw. 2l Erlenmeyer. Für grössere Flüssig-Kulturansätze wurden zunächst Submerskulturen von 50 ml in 250 ml Erlenmeyer aus der Schrägagarkultur erzeugt. Man impft diese Nährlösung mit 2-3 Platinösen aus einer Schrägagarkultur an und liess sie unter Beleuchtung in einem Orbital Incubator bei RT und 160 rpm während 30 Std. schütteln. Es wurde jeweils ein ml dieser Kulturen gebraucht, um weitere 50 ml Kulturen zu überimpfen. Für die grossen Ansätze (500 ml Nährlösung in 2l Erlenmeyer) wurden 50 ml der Submerskulturen verwendet. Nach dem Ueberimpfen wurden diese Kulturen weitere 20 Std. bei gleichen Bedingungen wie oben beschrieben incubiert.

11.2.3. Isolation der Bakterien

Die Bakterien wurden mittels Zentrifugation bei 10' 000 x g isoliert. Die sedimentierten Zellen wurden 3 mal mit 0, 1M Tris. HCl Puffer pH 7, 0 gewaschen.

11.3. Incorporationsversuche

11.3.1. Mit [$^2\text{H}_3$]-C(3')-MVA

Die isolierten Bakterienzellen aus 4 l Kulturen wurden in 320 ml 0, 1M Tris. HCl Puffer pH 7, 0 aufgenommen und je 40 ml in acht 250 ml Erlenmeyer verteilt. Das [$^2\text{H}_3$]-C(3')-MVA wurde vor der Incubation nach der Standardmethode verseift. Es wurden 40 mg Kaliumsalz der Mevalonsäure, 60mg Lysozym aus Hühnereiweiss, 22 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 75 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und 100 mg ATP in 10ml 0, 1M Tris. HCl Puffer (pH 7,0) gelöst und zu jedem Incubationansatz zugegeben. Die Incubation wurde unter Beleuchtung bei RT und durch kontinuierliches Schütteln (120 rpm) während 24 Std. durchgeführt.

11.3.2. Isolierung und Reinigung der Carotinoide

Die Isolierung der Carotinoide erfolgte nach Schema 19. Die Incubations-Ansätze wurden zunächst durch Celite filtriert. Anschliessend wurde der Rückstand solange mit Aceton gewaschen bis dieser praktisch farblos war. Dann wurde der Extrakt in einem Schütteltrichter aufgenommen und mit genügend Ether verdünnt. Diese Lösung wurde dann solange mit H_2O versetzt bis zwei Phasen erschienen. Nach der ersten Extraktion wurde die Wasserphase abgetrennt. Man wusch die Etherphase drei- bis vier mal mit Wasser und am Schluss mit Sole.

Die Etherphase wurde bei 30⁰ eingengt.

Dieses Rohextrakt wurde mit 10 proz. KOH in Methanol bei RT über Nacht verseift.

Der Carotinextrakt wurde nun in Petrolether aufgenommen und in einem Schütteltrichter mit 95 proz. Methanol gleichen Volumens versetzt. Die Epiphase wurde zweimal mit 95 proz. Methanol extrahiert. Die vereinigten Hypophasen wurden am Rotationsverdampfer eingedampft.

Dieser Carotinextrakt aus der Hypophase, der hauptsächlich Zeaxanthin enthielt, wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Hexan/Aceton 6 : 4 als Laufmittel gereinigt und am HV getrocknet. Dabei wurde 40mg Zeaxanthin isoliert. Die Veresterung des Zeaxanthins wurde über Nacht bei RT mit Ac_2O /Pyridin durchgeführt. Die isolierte Zeaxanthindiacetat wurde nach üblicher Aufarbeitung an einer präparativen Kieselgelplatte, mit Hexan/Ether 5 : 1; gereinigt.

Weitere Reinigung erfolgte im HPLC (System B).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 1, 074 (s, 6H, CH_3 -(17)/(17')); 1, 105 (s, 6H, CH_3 -(16)/(16')); 1, 582 (t, $^3\text{J}=12$, 2H, H-C(2)/(2')); 1, 721 (s, 6H, CH_3 -(18)/(18')); 1, 775 (dd, $^3\text{J}=12$, 2H, H-C(2)/(2')); 1, 966, 1, 972 (je s, 12H, CH_3 -(19)/(19') und CH_3 -(20)/(20')); 2, 049 (s, 6H, Ac.); 2, 108 (dd, 2H, H-C(4)/(4')); 2, 439 (dd, 2H, H-C(4)/(4')); 5, 059 (m, 2H, H-C(3)/(3')); 6, 101 (m, 2H, H-C(7)/(7')); 6, 114 (m, 2H, H-C(8)/(8')); 6, 160 (m, 2H, H-C(10)/(10')); 6, 257 (m, 2H, H-C(14)/(14')); 6, 365 (m, 2H, H-C(12)/(12')); 6, 607 bis 6, 995 (m, 4H, H-C(11)/(11'), H-C(15)/(15')).

$^2\text{H-NMR}$ (61,4 MHz, CHCl_3): 1, 072 (s, 6H, CD_3 (17)/(17')); 1, 720 (s, CD_3 (18)/(18')); 1, 963 (s, CD_3 (19)/(19'), (20)/(20')).

FT-IR (CHCl_3 , Differenzspektrum): 2241 (sh.), 2214 (s), 2173(w), 2106(w,?) und 2063(s,?).

11.3.3. Herstellung eines zellfreien Systems von *Flavobacterium R1560*

Das *Flavobacterium* wurden wie unter 11.2.1. beschrieben kultiviert.

Die Bakterien aus einer 4 l Kultur wurden nach Zentrifugation isoliert und mehrmals mit Tris.HCl Puffer (pH 7) gewaschen und anschliessend in 40 ml des gleichen Puffers suspendiert.

Mit einer French-Press (Aminco) wurden die Zellen bei 4⁰ dreimal mit 10' 000 psi aufgebrochen. Nach jedem Durchgang wurden einige mg Deoxyribonuclease I (DNase I) zur Lösung gegeben. Nicht aufgebrochenes Material und Zellwand- und Zellmembranstücke konnten durch eine Zentrifugation bei 6' 000 x g während 2Std. abgetrennt und verworfen werden. Der Ueberstand nach dieser Zentrifugation wurde als zellfreies System für Incubationversuche verwendet.

11.3.4. Incorporationversuche mit [16,16,16,16',16',16'-²H₆]- Lycopin

Der Incubationansatz enthielt:

20 µg Lycopin (**7e**) gelöst in 0,1ml Ethanol

10 µg Mevinolin

3 ml zellfreies System (ca. 500 mg Protein)

Total Volumen 4 ml 0, 1M Tris.HCl Puffer (pH 7,0)

400 solche Incubationsansätze wurden während 20 Std. bei 30⁰ unter kontinuierlichem Schütteln incubiert.

11.3.5. Isolation und Charakterisierung des biosynthetisierten β , β -Carotin

Die Incubation wurde durch Zugabe von Methanol gestoppt und mit einem Vortex gut gemischt. Die gesamten Incubationansätze wurden durch Celite filtriert und der Celite wurden solange mit Aceton extrahiert bis dieser praktisch farblos war. Nun wurde, wie unter 7.2.4.3. beschrieben, das Rohcarotin isoliert und verseift. Nach der Verseifung wurden die Carotine in Hypophase und Epiphase getrennt. Die Carotine aus der Epiphase wurden nun für weitere Reinigungen eingesetzt.

Zuerst wurden die Carotine aus der Epiphase säulenchromatographisch an Alox "Woelm" neutral Akt. III mit 5% Ether in Hexan getrennt. Anschliessend wurde die Carotinfraction an einer Kieselgelplatte mit Hexan gereinigt.

Die Trennung der (Z)/(E)- Isomere wurde durch HPLC erzielt. Sie wurde auf Spherisorb (System B) mit einem 0,6 ml Flow mit Detektion bei 445nm durchgeführt. Nach mehrmaliger Wiederholung wurde ca. 5mg (all-E)- β , β -Carotin isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 1,029 (s, 12H, CH_3 -(16)/(16'), CH_3 -(17)/(17')); ca. 1,465 (m, 4H, H-C(2)/(2')); ca. 1,633 (m, 4H, H-C(3)/(3')); 1,720 (s, 6H, CH_3 -(18)/(18')); 1,97 (s, 12H, CH_3 -(19)/(19'), CH_3 -(20)/(20')); 2,02 (m, 4H, H-C(4)/(4')); 6,11 bis 6,19 (m, 6H, H-C(7)/(7'), H-C(8)/(8'), H-C(10)/(10')); 6,265 (m, 2H, H-C(14)/(14')); 6,355 (d, $J=15$, 2H, H-C(12)/(12')); 6,618 bis 6,683 (m, 4H, H-C(11)/(11'), H-C(15)/(15')).

$^2\text{H-NMR}$ (61,4 MHz, CHCl_3) 1,035 (s, CD_3 -C(1/1')).

CD. (EPA (5:5:2)) Qualitativ

s.Fig 9

12. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. W. Porter & S. L. Spurgeon, "Biosynthesis of Isoprenoid Compounds", Vol. I & II, John Wiley & Sons, New York, **1981, 1983**.
- [2] O. Isler, H. Gutmann & U. Solms Ed. "Carotenoids", Birkhäuser, Basel, **1971**.
- [3] T. W. Goodwin in [2], S. 577 ff.
- [4] T. W. Goodwin, *Biochem. J.* **1972**, 11.
- [5] B. H. Davies, *Pure Appl. Chem.*, **1973**, 35, 1.
- [6] C. W. Coggins, G. Hennig Jr., H. Yokoyama, *Science* **1970**, 168, 1589.
- [7] C. H. Eugster, *Pure Appl. Chem.* **1979**, 51, 463.
- [8] C. H. Eugster in "Carotenoid Chemistry & Biochemistry", ed. G. Britton, T. W. Goodwin, Pergamon Press, Oxford **1982**, S. 1 ff.
- [9] H. P. Märki, Diss. Univ. Zürich **1980**, "Synthese von stereoselektiv deuterierten Carotinen".
- [10] A. Hofer, Diss. Univ. Zürich **1981**, "Chemische Synthese und Biosynthese von spezifisch isotoopenmarkierten Carotinen".
- [11] A. H. Zumbunn, Diss. Univ. Zürich **1985**, "Carotine mit (5Z)-Pseudoendgruppen".
- [12] G. Britton, *Pure Appl. Chem.* **1985**, 57, 701.
- [13] E. A. Shneour, *Biochim. Biophys. Acta* **1962**, 65, 510.
- [14] E. A. Shneour, M. Calvin, *Nature* **1962**, 196, 439.
- [15] H. Y. Yamamoto, C. O. Chichester, *Biochim. Biophys. Acta* **1965**, 109, 303.
- [16] G. Britton, W. J. S. Lockley, N. J. Patel, T. W. Goodwin, G. Englert, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1977**, 655.
- [17] G. Britton, A. P. Mundy, *Develop. Plant Biol.* **1980**, 6, 345.

- [18] G. Britton, in "Photosynthesis V, Chloroplast Development"
ed. G. Akoyunoglou, Balaban Internat. Science Services,
Philadelphia, **1981**, S. 261 ff.
- [19] G. Britton, T. W. Goodwin, W. J. S. Lockley, A. P. Mundy,
N. J. Patel, G. Englert, J. Chem. Soc., Chem. Commun. **1979**, 27.
- [20] D. J. Austin, J. D. Bu'Lock, D. Drake, *Experientia* **1970**, 26, 348.
- [21] J. D. Bu'Lock, D. J. Austin, G. Snatzke, L. Hruban, J.
Chem. Soc. Chem. Commun. **1970**, 255.
- [22] S. Takahashi, T. Oritani, K. Yamashita, *Agric. Biol. Chem.*
1987, 51, 2291.
- [23] C. D. Howes, P. P. Batra, *Biochim. Biophys. Acta* **1970**, 222, 17.
- [24] P. P. Batra, R. M. Gleason Jr., J. W. Louda, *Phytochemistry* **1973**, 12,
1309.
- [25] J. C. B. McDermott, A. Ben-Aziz, R. K. Singh, G. Britton,
T.W. Goodwin, *Pure Appl. Chem.* **1973**, 35, 29.
- [26] J. C. B. McDermott, D. J. Brown, G. Britton, T. W. Goodwin,
Biochem. J. **1974**, 144, 231.
- [27] J. C. B. McDermott, G. Britton, T. W. Goodwin,
J. Gen. Microbiol. **1973**, 77, 161.
- [28] G. Britton, R. K. Singh, T. W. Goodwin, *Biochim. Biophys. Acta*
1977, 488, 475.
- [29] K. Decker, H. Uehleke, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*
1961, 323, 61.
- [30] S. C. Kushwaha, C. Subbarayan, D. A. Beeler, J. W. Porter,
J. Biol. Chem. **1969**, 244, 3635.
- [31] S. C. Kushwaha, G. Suzue, C. Subbarayan, J. W. Porter,
J. Biol. Chem. **1970**, 245, 4708.
- [32] J. W. Porter, S. L. Spurgeon, *Pure Appl. Chem.* **1979**, 51, 609.
- [33] C. Papastephanou, F. J. Barnes, A. V. Briedis, J. W. Porter,
Arch. Biochem. Biophys. **1973**, 157, 415.

- [34] H. M. Hill, S. K. Calderwood, I. J. Rogers, *Phytochemistry* **1971**, *10*, 2051.
- [35] B. Camara, R. Monéger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981** *99*, 1117. B. Camara, *Pure Appl. Chem.* **1985**, *57*, 675.
- [36] P. M. Bramley, A. Than, B. H. Davies, *Phytochemistry* **1977**, *16*, 235.
- [37] D. J. Brown, G. Britton, T. W. Goodwin, *Biochem. Soc. Trans.* **1975**, *3*, 741.
- [38] M. Brown, G. Britton, persönliche Mitteilung (1984).
- [39] A. Hofer, C. H. Eugster, *Helv. Chim. Acta* **1982**, *65*, 365.
- [40] H. P. Märki, C. H. Eugster, *Helv. Chim. Acta* **1981**, *64*, 1257.
- [41] M. Eberle, D. Arigoni, *Helv. Chim. Acta* **1960**, *43*, 1508.
- [42] I. Scott, K. Shishido, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1980**, 400.
- [43] P. Lewar, J. MacMillan, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1983**, 1417.
- [44] M. Fétizon, M. Golfier, J. M. Louis, *Tetrahedron* **1975**, *31*, 171.
- [45] B. Rousseu, J. P. Beaucourt, L. Pichat, J. Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals **1983**, *20*, 557.
- [46] T. K. Chakraborty, V. Bhushan, S. Chandrasekaran, *Indian J. Chem.* **1983**, *22B*, 9.
- [47] L. J. Altmann, L. Ash, St. Marson, *Synthesis*, **1974**, 129.
- [48] D. Arigoni, A. Vasella, K. B. Sharpless, H. P. Jensen, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 7917.
- [49] H. P. Jensen, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 264.
- [50] U. T. Bhalerao, H. Rapoport, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4835, *ibid.*, **1971**, *93*, 5311.
- [51] M. A. Umbreit, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 5526.
- [52] W. D. Woggon, *Habilitationsschrift, Univ. Zürich*, **1985**.
- [53] Y. Masaki, K. Hashimoto, K. Kaji, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 4539, *ibid.*, **1978**, 5123.

- [54] W. G. Taylor, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 1020.
- [55] T. Suga, T. Hirata, Y. Hirano, T. Ito, *Chem. Lett.* **1976**, 1245.
- [56] E. J. Corey, J. A. Katzenellenbogen, G. H. Posner, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 4245.
- [57] R. F. Salinaro, J. A. Berson, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 2228.
- [58] V. L. Mizyuk, A. V. Semenovskii, *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Kim.* **1976**, *9*, 2074.
- [59] J. F. Normant, A. Alexakis, *Synthesis* **1981**, 841.
- [60] S. N. Huckin, L. Weiler, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 1082.
- [61] F. W. Sum, L. Weiler, *Tetrahedron*, **1981**, *37*, 303.
- [62] B. M. Trost, P. E. Strege, L. Weber, T. J. Fullerton, T. J. Dietsche, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 3407, 3416, 3426.
- [63] E. Keinan, D. Eren, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3165.
- [64] V. M. Dixit, F. M. Laskovics, W. I. Noall, C. D. Poulter, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 1967; V. J. Davisson, A. B. Woodside, C. D. Poulter, *Methods in Enzymol.* **1984**, *110*, 130; V. J. Davisson, T. M. Zabriskie, C. D. Poulter, *Bioorganic Chem.* **1986**, *14*, 46; V. J. Davisson, A. B. Woodside, T. R. Neal, K. E. Stremmler, M. Mühlbacher, C. D. Poulter, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4768.
- [65] F. Cramer, W. Böhm, *Angew. Chem.* **1959**, *71*, 775.
- [66] R. H. Cornforth, G. Popjak, *Methods in Enzymol.* **1969**, *15*, 359.
- [67] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh; *Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie*; 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1987**.
- [68] P. Bramley, *Advances in Lipid Research* **1985**, *26*, 243.
- [69] P. Bramley, G. Sandmann, *Phytochemistry* **1987**, *26*, 1935.
- [70] G. Britton, T. W. Goodwin, J. D. Brown, N. J. Patel, *Methods in Enzymol.* **1980**, *67*, 265.
- [71] G. Englert in [8], S. 107.
- [72] A. Endo, *J. Antibiot.* **1979**, *32*, 852.

- [73] A. Endo, M. Kuroda, K. Tanzawa, FEBS Lett. **1976**, 72, 323.
- [74] A. W. Alberts, J. Chen, G. Kuron, V. Hunt, J. Huff, C. Hoffman, J. Rothrock, M. Lopez, H. Joshua, E. Harris, A. Patchett, R. Monaghan, S. Currie, E. Stapley, G. Albers-Schönberg, O. Hensens, J. Hirshfield, K. Hoogsteen, J. Liesch, J. Springer, Proc. Natl.Acad. Sci. USA **1980**, 77, 3957.
- [75] K. Grob, Helv. Chim. Acta. **1965**, 48, 1362; idem ibid. **1968**, 51, 718.
- [76] R. J. Cogdell, Pure Appl. Chem. **1985**, 57, 723.
- [77] S. Liaaen-Jensen, Vortrag, gehalten an Internationalen Symposium über Carotinoide 1984 in München.
- [78] G. Britton, Vortrag, gehalten an Internationalen Symposium über Carotinoide 1987 in Boston.

CURRICULUM VITAE

Am 26. Juni 1956 wurde ich, Sasank Sekhar Mohanty, Bürger von Puri, Indien, als Sohn des Banamali Mohanty und der Kanaklata geb. Das in Puri geboren. Nach dem Besuch der Primarschule und High-School in Puri, trat ich 1972 ins College in Cuttack ein, welches ich 1974 mit der Reifeprüfung (Intermediate Science) abschloss. Im gleichen Jahr begann ich mein Zoologiestudium an der Utkal Universität in Cuttack und schloss 1976 mit dem B.Sc. (Honors and Distinction) ab. 1977 kam ich in die Schweiz, lernte 6 Monate Deutsch und immatrikulierte mich im Herbst 1977 an der Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich mit Hauptfach Biochemie. Im Dezember 1981 erlangte ich das Diplom in Biochemie. Im Mai 1982 begann ich die Arbeit an der Dissertation in Organischer Chemie. Sowohl Diplomarbeit als auch Dissertation standen unter der Leitung von Herrn Prof. C.H. Eugster. Den experimentellen Teil meiner Doktorarbeit habe ich im Herbst 1986 abgeschlossen. Während meiner Doktorarbeit war ich als Assistent in Praktika und Vorlesungen am Organisch Chemischen Institut tätig.

Während meines Studiums besuchte ich Vorlesungen, Praktika und Uebungen bei folgenden Herrn Professoren und Dozenten:

J.H. Ammeter, K. Bernauer, J.H. Bieri, M.A. Billeter, H. Binz, M. Birnstiel, H.R. Bosshard, H. Brigel, P.S. Chen, P. Christen, A.S. Dreiding, C.H. Eugster, H. Fischer, E.R.F. Gesing, R. Grauer, B. Gutte, H.J. Hediger, H. Heimgartner, M. Hesse, L. Hoesch, R. Humbel, R. Hütter, R. Imhof, A. Jakob, M. Karpf, J. Kägi, V. Kisakürek, E. Kubli, K. Lerch, J. Lindenmann, J. Müller, H.R. Oswald, W.v. Philipsborn, H. Ramseier, M. Rey, P. Rüedi, Ch. Schlatter, W. Sieber, P.A. Stadler, H. Streuli, A. Vasella, M. Viscontini, G. Wagnière, C. Weissmann, K. Wilson, W.D. Woggon und V. Ziswiler.

